



Ulla Tienhaara

Suomenajokoiran follikulaari- dysplasian ja beaglen glaukooman geenivirheiden kartoitusta

Metropolia ammattikorkeakoulu
Insinööri (AMK)
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma
Insinöörityö
10.11.2011

Tekijä Otsikko	Ulla Tienhaara Suomenajokoiran follikulaaridysplasian ja beaglen glaukooman geenivirheiden kartoitusta
Sivumäärä Aika	49 sivua + 2 liitettä 10.11.2011
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	biolääketiede
Ohjaajat	filosofian maisteri Kaisa Kyöstiä professori Hannes Lohi filosofian tohtori Annika Järviluoma
<p>Follikulaaridysplasia eli mustan karvatupen kasvuhäiriö ja glaukooma eli silmänpainetauti kuuluvat koirien periytyviin sairauksiin. Follikulaaridysplasia aiheuttaa karvojen harvenemista ja haurastumista mustan karvan alueella etenkin korvissa, selässä ja kyljissä. Sairaudelle altistaa turkin värin laimentuminen, jolloin melaniinin eli tumman pigmentin kuljetuksessa ihossa ja karvasa on ongelmia; samanlaisia melaniinikasaumia havaitaan sekä follikulaaridysplasiaa sairastavien yksilöiden että turkin värin laimentumista ilmentävien yksilöiden kudoksenäytteissä.</p> <p>Tässä tutkimuksessa oli tarkoituksena selvittää, löytyykö follikulaaridysplasiaa sairastavilta suomenajokoirilta virhe <i>MLPH</i>- eli melanofiiliinigeenistä, joka aiheuttaa homotsygoottisena turkin värin laimentumista. Tätä varten sekvensoitiin 15 sairaan suomenajokoiran ja 15 samanrotuisen kontrollin mahdollisen geenivirheen sisältävä alue geenistä. Yhdeltäkään tutkituista koirista ei löytynyt kyseistä geenivirhettä homotsygoottisena, jolloin sen osallisuus suomenajokoiran follikulaaridysplasiassa suljettiin pois.</p> <p>Glaukooma johtuu silmän verkkokalvon gangliosolujen etenevästä surkastumisesta, joka johtaa edelleen näköhermon rappeutumiseen. Sairaudessa on usein myös epätasapainoa kammionesteiden tuotossa ja ulosvirtauksessa, jolloin silmänpaine nousee. Glaukooma aiheuttaa hoitamattomana sokeuden, joten nopea hoitoon pääsy on tärkeää. Yksi glaukoomaa aiheuttava geenivirhe on löydetty beaglerodulla <i>ADAMTS10</i>-geenistä, jonka tiedetään ihmisellä säätelevän silmänpainetta. Yhdysvalloissa sen kantajafrekvenssiksi oli arvioitu noin 1 % normaalissa beaglepopulaatiossa.</p> <p>Glaukoomatutkimuksessa selvitettiin glaukoomaa aiheuttavan geenivirheen esiintyvyyttä suomalaisissa beagleissa. Tutkimuksessa käytettiin reaaliaikaista PCR:ää ja spesifistä, mutaation tunnistavaa TaqMan-kemialla. Menetelmällä tutkittiin 177 suomalaista beaglenäytettä ja kuusi glaukoomaa sairastavan yksilön näytettä muista roduista. Tutkituista beaglenäytteistä ei löytynyt yhtään kantajaa, ja myös glaukoomaa sairastavat muunrotuiset yksilöt olivat villityyppejä todennäköisesti eri geenivirheen takia kuin yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa beagleilta oli löytynyt.</p> <p>Kummassakin tutkimuksessa geenivirheen löytyminen mahdollistaisi geenitestin kehittämisen kyseisiin sairauksiin. Vaikka geenivirheitä ei nyt löydetty, saadut tiedot auttavat kuitenkin jatkamaan tutkimuksia eteenpäin: molemmissa tutkimuksissa voidaan keskittyä nyt seulomaan uusia kandidaattigeenejä.</p>	
Avainsanat	follikulaaridysplasia, glaukooma, turkin värin laimentuminen, geenit, geenitesti

Author	Ulla Tienhaara
Title	Mapping the gene mutations behind Finnish Hound's black hair follicular dysplasia and Beagle's glaucoma
Number of pages	49 pages + 2 appendices
Date	10 November 2011
Degree	Bachelor of Engineering
Degree programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialization	Biomedicine
Instructors	Kaisa Kyöstiä, Master of Science Hannes Lohi, Professor Annika Järviluoma, Doctor of Philosophy
<p>Black hair follicular dysplasia (BHFD) and glaucoma are inherited diseases in dogs. BHFD causes hair loss especially on earlobes and dorsal areas. Coat color dilution is a pigmentation phenotype that is a predisposing risk factor for BHFD. Both diseases are characterized by a defective transport of melanin leading to clumped melanin in the skin and hair, visible in biopsies.</p> <p>This study strives to find out if Finnish Hounds with BHFD have the mutation in melanophilin gene (<i>MLPH</i>) associated with coat color dilution. The mutation area from <i>MLPH</i> gene was sequenced from 15 Finnish Hounds with BHFD and 15 controls. No indication of the homozygous mutation was found, implying this mutation has no role in BHFD in Finnish Hounds</p> <p>Glaucoma results from the progressive atrophy of a retinal ganglion cell, eventually causing deterioration of the optic nerve. Glaucoma is often associated with an increased pressure of the fluid in the eye. Untreated glaucoma causes blindness, making early treatment important. A homozygote mutation in the <i>ADAMTS10</i> gene associated with glaucoma has been found in a colony of Beagles in the USA. This gene is known to regulate the intraocular pressure on humans.</p> <p>The other aim was to determine the carrier frequency of the disease allele in the Finnish Beagle population, suggested being approximately 1% in the USA. 177 Finnish Beagle samples and six dogs with glaucoma from other breeds were screened using Real-Time PCR and mutation specific TaqMan chemistry. No carriers were found and even the unhealthy were wild types, suggesting that they might have different gene mutation than the Beagles in the colony.</p> <p>In both studies, finding the mutation causing the disease would make it possible to develop a specific gene test. Although mutations were not found, these studies create a platform for future studies, allowing concentration on screening new candidate genes.</p>	
Keywords	black hair follicular dysplasia, glaucoma, coat color dilution, genes, gene tests

Sisällys

Lyhenteet

1 Johdanto	<u>1</u>
2 Koiran ainutlaatuinen perimä	<u>2</u>
2.1 Kesyyntymisen historiaa	<u>2</u>
2.2 Geneettisen monimuotoisuuden uhat	<u>3</u>
2.3 Koira geneettisen tutkimuksen mallina	<u>5</u>
3 Koirarotujen historiaa	8
3.1 Suomenajokoira	8
3.2 Beagle	9
4 Taustaa follikulaaridysplasiasta ja glaukoomasta	<u>12</u>
4.1 Follikulaaridysplasia	<u>12</u>
4.2 Glaukooma	<u>16</u>
5 Geenitestit	<u>21</u>
5.1 Geenitestien hyödyt ja ongelmat	<u>21</u>
5.2 Geenitestien menetelmät	<u>23</u>
5.2.1 DNA-mutaatiotestit	<u>23</u>
5.2.2 DNA-markkeritestit	<u>24</u>
5.2.3 Geenituotetestit	<u>25</u>
6 Tutkimusmenetelmät	<u>26</u>
6.1 Näytteiden valinta	<u>26</u>
6.2 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen	<u>26</u>
6.3 DNA-pitoisuuksien määrittäminen ja DNA-laimennosten tekeminen	<u>27</u>
6.4 Polymeraasiketjureaktio (PCR)	<u>28</u>
6.4.1 PCR-alukkeiden suunnittelu	<u>28</u>
6.4.2 PCR:n suoritus	28
6.5 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)	29
6.6 PCR-tuotteen puhdistus	<u>30</u>
6.7 Kapillaarisekvensointi	<u>31</u>
6.8 Variant Reporter -tietokoneohjelma	<u>31</u>
6.9 Reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio (RT-PCR)	<u>32</u>
6.9.1 Tarvittavat alukkeet ja koettimet	<u>34</u>
6.9.2 RT-PCR:n suoritus	<u>35</u>

7 Tulokset	<u>37</u>
7.1 Suomenajokoiran follikulaaridysplasia	<u>37</u>
7.2 Beaglen glaukooma	40
8 Yhteenveto	<u>42</u>
8.1 Tutkimustuloksista	42
8.2 Tulevaisuuden näkymät	44
Lähteet	45
Liitteet	
Liite 1. Lista työssä käytetyistä suomenajokoiranäytteistä	
Liite 2. Lista suomenajokoirilta löydetyistä sekvenssimuutoksista	

Lyhenteitä

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , yhden emäksen muutos DNA-sekvenssissä
CDA	<i>color dilution alopecia</i> , värin laimentumisen alopecia
<i>MLPH</i> -geeni	MLPH <i>melanophilin</i> , melanofiiliini
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , lähetti-ribonukleiinihappo
POAG	<i>primary open angle glaucoma</i> , primaarinen avokulmaglaukooma
<i>ADAMTS10</i> -geeni	ADAM <i>metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10</i>
PRA	<i>progressive retinal atrophy</i> , verkkokalvon asteittainen surkastuma
bp	<i>base pair</i> , emäspari
NCBI	the National Center for Biotechnology Information
UCSC	University of California Santa Cruz

1 Johdanto

Koiran genomi eli geeneihin koodattu perintöaines kartoitettiin vuonna 2005, ja se avasi aivan uudet mahdollisuudet jalostukseen ja tautigeenien tunnistamiseen (Lindblad-Toh ym. 2005). Helsingin yliopistossa ja Folkhälsanin tutkimuskeskuksessa toimii koirien geenitutkimusohjelma, jonka tavoitteena on tunnistaa perinnöllisiin sairauksiin liittyviä geenivirheitä koiraroduissa. Kun tällainen geenivirhelöytö tehdään, voidaan virheen tunnistamiseen kehittää geenitesti, joka mahdollistaa sairaiden, terveiden ja kantajayksilöiden erotuksen jo varhaisessa vaiheessa. Tämä on ensiarvoisen tärkeää, sillä usein perinnölliset sairaudet puhkeavat vasta myöhäisemmällä iällä ja koira on jo saatettu käyttää jalostukseen. Geenitestit mahdollistavat myös valiokoirien käyttämisen jalostuksessa, vaikka ne olisivatkin geenivirheenkantajia. Näiden lisäksi geenitestejä voidaan käyttää myös diagnostisena apuna.

Tämän päättöyön tarkoituksena on selvittää, onko suomenajokoiran follikulaaridysplasian eli mustan karvatupen kasvuhäiriön taustalla sama geenivirhe, kuin on aiemmin liitetty turkin värin laimentumiseen koirilla (Drögemüller ym. 2007), sekä katsoa, löytyykö tutkimusryhmän suomalaisista beaglenäytteistä äskettäin USA:ssa beagleilta paikallistettua glaukoomaa eli silmänpainetautia aiheuttavaa geenivirhettä (Kuchtey ym. 2011). Molemmissa tapauksissa geenitaustan tunnistaminen mahdollistaisi geenitestin kehittämisen, jolloin kyseisiä sairauksia voitaisiin tehokkaasti vastustaa.

Tutkimuksiin valittiin follikulaaridysplasia ja glaukooma, koska molemmat ovat perinnöllisiä ja yleisesti eri koiraroduilla esiintyviä sairauksia. Niitä tutkittaessa käytetään eri menetelmiä. Suomenajokoiran follikulaaridysplasiaa aiheuttavaa geenivirhettä etsittäessä käytetään perinteistä PCR:ää (*polymerase chain reaction*; polymeerasiketjureaktio) ja sekvensointia eli geenin emäsjärjestyksen määrittämistä. Beaglen glaukoomaa aiheuttavaa geenivirhettä tutkittaessa käytetään reaaliaikaista PCR:ää ja mutaatiolle spesifiä TaqMan-kemialla, joka on menetelmä, jota käytetään usein myös varsinaisissa geenitesteissä.

2 Koiran ainutlaatuinen perimä

Koiran uskotaan eriytyneen harmaasudesta omaksi lajikseen noin 15 000–100 000 vuotta sitten (Savolainen ym. 2002: 1610; Lindblad-Toh ym. 2005: 803), tarkasta ajankohdasta on tutkijoiden kesken edelleen erimielisyyttä. Siitä ollaan nykyään kuitenkin samaa mieltä, että koiran esi-isä todella on susi – sen todistavat geenitutkimuksista saadut tulokset. Koira ja susi ovat edelleenkin noin 99,8-prosenttisesti geneettisesti samanlaisia, toisin kuin esimerkiksi kojootti, jota on myös ehdotettu koiran esi-isäksi. (Lindblad-Toh ym. 2005: 803, 810.)

Koira (*Canis familiaris*) kuuluu koiraeläinten heimoon (*Canidae*), joka puolestaan on osa petoeläinten lahkoa (*Carnivora*) nisäkkäiden luokassa. Koiraeläinten heimon *Canis*-sukuun lasketaan kuuluvaksi kahdeksan lajia: koira, susi (*C. lupus*, *C. rufus*, *C. siemensis*), kojootti (*C. latrans*) sekä sakaali (*C. aureus*, *C. mesomelus*, *C. adustus*). Nämä kaikki suvun lajit pystyvät lisääntymään keskenään ja saamaan lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä. (Galibert & André 2008: 69; Webster & Karlsson 2009: 3.)

2.1 Kesyyntymisen historiaa

Yksilön eri ominaisuuksia säätelevät geenit sijaitsevat kaksijuosteisessa DNA-ketjussa (*deoxyribonucleic acid*; deoksiribonukleinihappo), joka on koirilla noin 2,5 miljardia emäsparia pitkä. Ihmisen DNA:n pituus on noin kolme miljardia emäsparia. Koirien DNA on tiiviisti pakattuna 39 kromosomiparissa, ihmisellä 23:ssa. Geenien määrä on koirilla ja ihmisillä kuitenkin suunnilleen sama. (Lohi 2009; Galibert & André 2008: 69.)

Arkeologiset löydökset viittaavat siihen, että koira oli ihmisen ensimmäinen kotieläin (Savolainen ym. 2002: 1610; Galibert & André 2008: 67). Mitokondriaalisen DNA:n monimuotoisuutta tutkimalla Savolaisen ym. (2002) tutkimusryhmä tuli lopputulokseen, että koira olisi kesyyntynyt sudesta noin 15 000 vuotta sitten Itä-Aasiassa. Mitokondriaalista DNA:ta saadaan mitokondrioista eli soluorganelleista, jotka muuttavat ruuasta saatavan kemiallisen energian sellaiseen muotoon, että solut pystyvät sitä hyödyntämään. Mitokondriot periytyvät valtaosalla monisoluisista eliöistä vain äidiltä, joten mitokondriaalisen DNA:n avulla voidaan jäljittää myös esiäitejä. Mitokondriaalisen DNA:n variaatioiden perusteella tultiin lopputulokseen, että olisi viisi emäsusilinjaa, joista koirat polveutuisivat (Savolainen ym. 2002: 1610). Tuoreempi tutkimus, jonka vonHoldt

kollegoineen teki vuonna 2010, perustuu genominlaajuisiin SNP (*single nucleotide polymorphism*; yhden emäksen muutos)- ja haplotyyppianalyysihin, joissa verrattiin DNA-näytteitä eri koiraroduista harmaasusinäytteisiin eri populaatioista ympäri maailmaa. Haplotyyppillä tarkoitetaan alleeleja eli geenin vaihtoehtoisia muotoja, jotka yksilö perii yhdessä toiselta vanhemmistaan; ne ovat samassa kromosomissa. Tämän tutkimuksen mukaan koiraroduilla oli eniten yhteisiä haplotyyppisiä Lähi-idän ja joillain roduilla Euroopan harmaasusien kanssa. Tulosten todettiin olevan maantieteellisesti yhdenmukaisia löydettyjen arkeologisten koirien jäännösten kanssa, jotka ovat peräisin 12 000–31 000 vuoden takaa. (vonHoldt ym. 2010: 898.)

Koiran kesyyntyminen ja eroaminen harmaasudesta omaksi lajikseen oli todennäköisesti monivaiheinen prosessi. Koira kehittyi ihmisen rinnalle molempia osapuolia hyödyttäneen suhteen kautta; koirat ja ihmiset jakoivat keskenään elintilan ja ruuanlähteet. (Lindblad-Toh ym. 2005: 803.) Ihmiset ovat todennäköisesti alusta asti suosineet koiria, joilla oli tiettyjä piirteitä selviytyä paremmin esimerkiksi paimentamisesta, vartioimisesta tai metsästyksestä. Tämä keinotekoinen valinta on lisääntynyt kahden viime vuosisadan aikana huomattavasti, kun nykyiset koirarodut on luotu. (Galibert & André 2008: 68.)

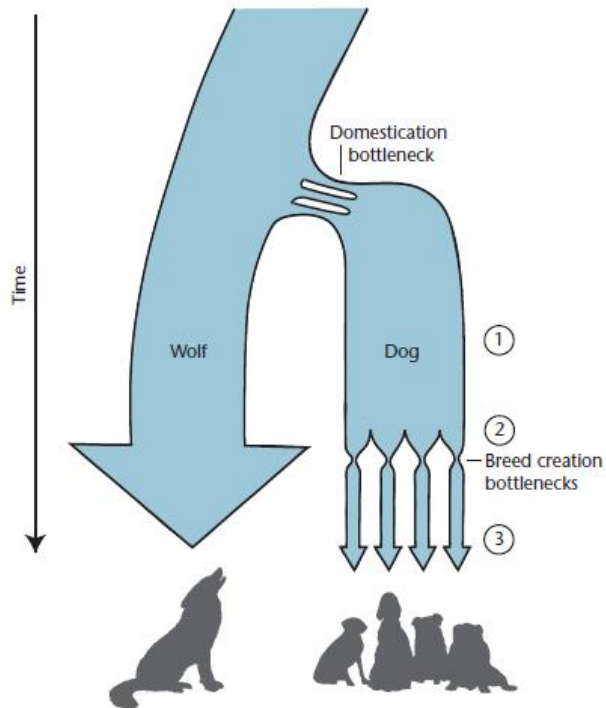
2.2 Geneettisen monimuotoisuuden uhat

Missään muussa eläinlajissa ei havaita niin suurta fenotyypin eli ilmiön vaihtelua kuin koirissa. Tämän voi todeta esimerkiksi vertaamalla tanskandoggia ja jopa sata kertaa kevyempää chihuahuaa (kuva 1). (Galibert & André 2008: 68.) Myös käyttäytyminen ja kyky suorittaa erilaisia tehtäviä vaihtelevat rodusta toiseen. Nämä valtavat erot ovat ihmisen harjoittaman keinotekoisesti valinnan tulosta. (Galibert & André 2008: 68; Webster & Karlsson 2009: 6.)



Kuva 1. Havainnollistava esimerkki eri koirarotujen ilmiösuojen vaihtelusta (Galibert & André 2008: 68).

Valitettavasti keinotekoisella valinnalla on ollut myös negatiivisia vaikutuksia, etenkin koirien terveyteen. Kun on keskitytty vain haluttuihin ominaisuuksiin ja käytetty vain tiettyjä harvoja huippuyksilöitä jalostukseen, on koirien geneettinen monimuotoisuus heikentynyt huomattavasti. Myös sisäsiittoisuus ja puhtasrotuisuuden vaaliminen ovat vaikuttaneet heikentävästi tilanteeseen. Sisäsiittoisuuden takia geenivirheet ja perinnölliset sairaudet ovat rikastuneet rotuihin. (Lohi 2009; Galibert & André 2008: 68.) Puhdasrotuisuuden vaaliminen on luonut jokaisesta rodusta täysin muista rodusta eristyneen populaation; koirarodut ovatkin geneettisesti hyvin kaukana toisistaan (Galibert & André 2008: 68; Parker ym. 2004: 1160–1161). Tämä on johtanut rotukohtaisen ulkonäön ja luonteen lisäksi omiin tautiperimiin rotujen sisällä (Lohi 2009; Galibert & André 2008: 68; Parker ym. 2004: 1160–1161). Koiran historiassa on ainakin kaksi isoa pullonkaulaa, jotka ovat muokanneet nykyisten koirarotujen haplotyyppirakennetta sekä johtaneet geneettisen monimuotoisuuden pienenemiseen: kesyyntyminen sudesta tuhansia vuosia sitten ja koirarotujen jalostaminen parisataa vuotta sitten (kuva 2). Muita pullonkauloja ovat olleet paikalliset tapahtumat, kuten maailmansodat. (Webster & Karlsson 2009: 4–5; Lindblad-Toh ym. 2005: 803.)



Kuva 2. Koiran populaatiohistorian kaksi pullonkaulaa. Ensimmäinen geneettinen pullonkaula syntyi koiran kesyyntyessä harmaasudesta. Toinen pullonkaula syntyi, kun nykyiset koirarodut jalostettiin. (Webster & Karlsson 2009)

2.3 Koira geneettisen tutkimuksen mallina

Koiran genomi on viides nisäkkään genomi, joka on sekvensoitu kokonaan. Sekvensoinnissa käytettiin shotgun-menetelmää. (Lindblad-Toh ym. 2005: 803–804.) Termillä tarkoitetaan satunnaissekvensointia, jossa genomi pilkotaan satunnaisen pituisiksi paloiksi, joiden emäsjärjestys määritetään (Heikkinen ym. 2002: 35–36). Sekvensointi kattoi noin 99 % eukromaattisesta eli transkriptionaalisesti aktiivisesta genomista (Lindblad-Toh ym. 2005: 803–804).

Sekvensoinnin kohteena olleen bokserinartun sekvenssejä osittaisvertailtiin 11 muun erirotuisen koiran sekvenssipätkiin. Vertailun tuloksena saatiin kattava SNP-kirjasto rotujen väliltä. Kirjasto sisältää yli 2,5 miljoonaa SNP:tä eli koirilla esiintyy keskimäärin yksi SNP tuhatta emäsparia kohti. (Lindblad-Toh ym. 2005: 803–804, 810.) Ihmisen genomi sisältää noin kymmenen miljoonaa perinnöllistä SNP:tä eli yhden SNP:n noin 300 emäsparin välein (Groop ym. 2007: 1450).

SNP:t ovat geneettisen vaihtelun yleisin muoto; yli 90 % yksilöiden välisistä eroista selittyy SNP:illä (Roche Diagnostics GmbH. 2008: 216). Mutta tietyt SNP:t voivat aiheuttaa myös sairauden muuttaessaan geeninä tai sen koodaamaa proteiinia. Jos epäillään vahvasti tietyllä geenillä olevan osuutta sairauden synnyssä, paras tapa on tutkia yhteyttä sairauden ja kyseisen ehdokas- eli kandidaattigeenin SNP:iden välillä. (Groop ym. 2007: 1450–1451.)

SNP:itä voidaan käyttää geenitutkimuksissa myös jonkin sairauden tai ominaisuuden merkinä, markkerina. Tämä on mahdollista silloin, kun sairausalleeli ja markkerialleeli sijaitsevat kromosomissa niin lähellä toisiaan, että ne periytyvät yhdessä eikä väliin osu rekombinaatiota eli uudelleenjärjestäytymistä. Rekombinaation seurauksena syntyy uusia ominaisuusyhdistelmiä suvullisessa lisääntymisessä. Rekombinaation puuttumista kutsutaan kytkentäepätasapainoksi (*linkage disequilibrium*). (Groop ym. 2007: 1450.)

Genomialueita, joissa ei juuri tapahdu rekombinaatiota, kutsutaan haplotyyppiblokeiksi. (Groop ym. 2007: 1450.) Haplotyyppiblokeissa olevat alleelit eivät periydy eri yksilöille toisistaan riippumatta, kuten normaalisti tapahtuu, vaan aina tietyssä järjestyksessä. Tämä johtuu haplotyyppiblokkien alleelien välisestä kytkentäepätasapainosta.

Koiraroduilla esiintyy heti ihmisen jälkeen eniten perinnöllisiä sairauksia. Niistä monet, kuten syövät, sydäntaudit, kuurous, sokeus, epilepsia ja jopa psykiatriset sairaudet, ovat samoja kuin ihmisellä (Webster & Karlsson 2009: 4; Lindblad-Toh ym. 2005: 803; Galibert & André 2008: 68). Noin 50 % koirarotujen välisistä eliniänodotteiden eroista johtuu perinnöllisten sairauksien aiheuttamasta kuolleisuudesta; geneettiset taudit kuuluvatkin koirien yleisimpiin kuolinsyihin (Sargan 2004: 503).

Mediaani-ikä rotukoirilla on kymmenen vuotta, sekarotuisilla 11 vuotta. Korkea ikä on yleisin koiran kuolemaan tai lopetukseen johtava syy, sen jälkeen tulevat syövät, tuki- ja liikuntaelimestön sairaudet, sydänsairaudet sekä käytösongelmat, jotka kaikki ovat perinnöllisiä. (Bonnert ym. 1997: 40, 42; Proschowsky ym. 2003: 63–64.)

2000-luvulle asti sairauksien molekyylogeneettisistä tutkimuksista saadut hyödyt ovat virranneet pääasiassa ihmispuolelta koirille. Nyt on kuitenkin alussa aikakausi, jolloin koirien geneettisten tautien tutkimuksista tullaan todennäköisesti saamaan suuri hyöty myös ihmisgenetiikan ja sen sairauksien ymmärtämisessä. (Patterson 2000: 7–8.) Ensimmäinen esimerkki, jossa tunnistettiin tautigeeni ensin koirilta ja sitten vasta ihmisiltä, on vuodelta 1999. Kyseessä oli narkolepsiaa aiheuttava geenivirhe (Lin ym. 1999).

Sairautta aiheuttavat kahden proteiinia koodaavan eksonin deleetit oreksiinin reseptori 2:n geenissä. Oreksiini on neuropeptidi eli hermoston toimintaan vaikuttava viestimolekyyli. Sairauden geneettisiä syitä on ollut vaikea selvittää ihmisillä, koska ihmisten narkolepsiatapaukset ovat usein yksittäisiä. Dobermanneilla ja labradorinnoutajilla puolestaan sairaus periytyi tietyissä suvuissa. (Lin ym. 1999: 365–366.) Kun geenivirhe onnistuttiin paikantamaan koirista, saatiin identifioitua ainakin yksi narkolepsian taustalla oleva molekyylogeneettinen mekanismi, ja tätä on voitu hyödyntää ihmispotilaiden hoidossa (Patterson 2000: 8).

Koiran eriytyminen sudesta ja vuosikymmenten rotujalostukset ovat johtaneet laajaan kytkentäepätasapainoon sekä laajoihin haplotyyppiblokkeihin koiran perimässä. Tämä yhdessä koiran ainutlaatuisen populaatiorakenteen kanssa, jossa eri rodut muodostavat toisistaan eristäytyneitä populaatioita, mahdollistavat mendelistisesti periytyvien ominaisuuksien ja sairauksien tutkimisen huomattavasti vähemmällä markkereilla ja yksilöillä kuin ihmisen tautimalleissa. (Kuchtey ym. 2011; Webster & Karlsson 2009: 4; Lindblad-Toh ym. 2005: 803, 813, 816–817; Galibert & André 2008: 71–72.) Mendelistisellä periytymisellä tarkoitetaan mendelististen periytymissääntöjen mukaisesti periytyvää ominaisuutta tai sairautta; periytyminen tapahtuu yhden geenin välityksellä joko ei-sukupuoleen sidotusti vallitsevasti eli autosomaalisesti dominantisti, autosomaalisesti peittyvästi eli resessiivisesti tai X-kromosomaalisesti vallitsevasti tai peittyvästi. Koirat ovat tärkeässä asemassa tutkittaessa ihmisen sairauksia myös sen vuoksi, että niillä on suhteellisen pitkä eliniän odote ja suuri koko, sekä lisäksi monet koiran kudokset toimivat samalla lailla kuin ihmisen (Sargan 2004: 503). Lisäksi koiran DNA-sekvenssi on homologinen, eli se on samassa järjestyksessä ihmisen DNA-sekvenssin kanssa ja geenien toiminta on samanlaista (Patterson 2000: 7). Koiran kartoitettu genomi ja SNP-kirjasto auttavat perinnöllisyystieteilijöitä ja tautitutkijoita selvittämään perinnöllisten tautien takana piileviä geenivirheitä. Koiria käytetäänkin yhä enenevässä määrin tautimalleina ihmisen vastaavissa sairauksissa.

3 Koirarotujen historiaa

Koirarotujen järjestelmällinen jalostaminen alkoi 1800-luvulla Englannissa (vonHoldt ym. 2010: 898). Tuolloin perustettiin ensimmäiset rotujärjestöt ja alettiin julkaista rotumääritelmiä. Eri maat alkoivat kehittää omia rotujaan; Suomessa näihin rotuihin kuului muun muassa suomenajokoira ja Englannissa beagle. Tänä päivänä erilaisia koirarotuja tunnetaan yli 400. (Parker ym. 2004: 1160)

3.1 Suomenajokoira

Ajokoirametsästystä harrastettiin Suomessa 1800-luvulla monen rotuisilla koirilla. Suomen Kennelklubin perustamisen aikoihin vuonna 1889 alettiin kehittää sopivaa ajokoirarotua Suomen olosuhteisiin; koiran tulisi pärjätä hyvin mäkisessä ja runsaslumisessa maastossa. Jalostustyötä tehtiin maassa jo olevien ajokoirarotujen avulla. Rotukirjan osastoon ”suomalainen ajokoira” pääsivät määriteltujen rotumerkkien mukaisiksi todetut ajokoirat jälkeläisineen, joilla oli palkinto sekä näyttelyistä että ajokokeista. (Suomen Ajokoirajärjestö.)

Ajokoiran ominaisuuksia muutettiin ja vahvistettiin moneen kertaan 1900-luvun alkupuolella. Ulkomuodon ohella jalostettiin koko ajan myös käyttöominaisuuksia. Suomenajokoiran väriyukseksi vakiintui kolmivärinen musta mantteli (kuva 3), ihannekorkeudeksi uroksilla 57–59 cm ja nartuilla 54–56 cm, ja käyttöominaisuuksia testattiin ajokokeilla. (Suomen Ajokoirajärjestö.)



Kuva 3. Suomenajokoira (Suomen Kennelliitto).

Suomenajokoiralla on nähtävissä hidasta nousua keskimääräisessä sukusiitosasteessa (Mäki 2004: 18). Sukusiitosaste lasketaan jakamalla koiran vanhempien sukulaisuussuhde kahdella. Pennun sukusiitosaste ei siis riipu vanhempien sukusiitosasteista vaan siitä, ovatko vanhemmat keskenään sukua. Jos vanhemmat ovat esimerkiksi sisaruksia keskenään, on niiden sukulaisuussuhde 50 % ja niiden pentujen sukusiitosaste 25 %. Jos vanhemmat ovat keskenään puolisisaria, on niiden sukulaisuussuhde 25 % ja niiden pentujen sukusiitosaste 12,50 %. Haitallisen sukusiitosasteen rajana pidetään yleensä kymmentä prosenttia; jalostuksessa tulisi kuitenkin pyrkiä pitämään sukusiitosaste kuuden prosentin alapuolella, eli serkusparituksiakin (pentujen sukusiitosaste 6,25 %) olisi syytä välttää (Mäki ym. 2001: 220).

Sukusiitosasteen nouseminen on tyypillistä suljetuille koirapopulaatioille, joihin ei tule uusia tuontikoiria (Mäki 2004: 18). 1990-luvulla suomenajokoiria, joiden sukusiitosaste oli yli kymmenen prosenttia, oli noin kuusi prosenttia kannasta (Karjalainen & Ojala 1997: 38). Tänä päivänä luvun voidaan olettaa olevan jo hieman korkeampi. Suljetun populaation ohella sukusiitosastetta nostaa tiettyjen harvojen urosten suosiminen astutuksissa; 13 vuoden tarkastelujaksolla (1978–1991) suomenajokoirauroksista astutukseen käytettiin vain 8-12 %, nartuilla vastaava jakauma oli 19–23 % (Mäki ym. 2001: 223).

Suomenajokoiraa on Suomessa edelleen suosittu rotu. Vuonna 2010 suomenajokoiria rekisteröitiin 1 784, ja rotu oli siten kolmanneksi suosituin (Suomen Kennelliitto 2011). Suomenajokoiria rekisteröidään kasvavaan tahtiin myös Ruotsissa ja Norjassa, joten se on suomalaisena rotuna varsin laajalle levinnyt. Suosion taustalla lienee suomenajokoiran loistava menestyminen ajomestaruuskilpailuissa. Suomenajokoiran jalostuksen päätavoite on edelleenkin hyvien käyttöominaisuuksien vaaliminen jäniksen ja ketun ajoa silmällä pitäen. (Suomen Ajokoirajärjestö.)

3.2 Beagle

Beagle (kuva 4) on isobritannialainen ajava koirarotu, jonka ensimmäiset yksilöt elivät 1300-luvulla. Rotu alkoi yleistyä 1600-luvulla, ja esimerkiksi Yhdysvaltoihin se levisi 1800-luvulla. Suomeen saapui vuonna 1911 ensimmäinen beaglepari, mutta muutaman pentueen jälkeen beagleja alettiin risteyttää isojen ajokoirarotujen kanssa. Suomalainen beaglekanta onkin peräisin vasta vuonna 1956 Yhdysvalloista tuoduista kolmesta

koirasta. Beagle vakiinnutti Suomessa asemansa jo 1960-luvulla suomenajokoiran jälkeksi toiseksi levinneimpänä ajokoirarotuna. (Särmä 2011.)



Kuva 4. Beagle (Suomen Beaglejärjestö).

Vaikka beagle alkoi jo 1960-luvulla levitä myös näyttely- ja seurakoiraksi, se on pysynyt kuitenkin erittäin hyvin metsästyskoirana, joita on 85–90 % Suomen beagleista. Rodun suosio metsästäjien keskuudessa perustuu luontaiseen jäniksenajoon ja hyvään vaimuun. Rotujärjestö painottaakin rodun metsästysominaisuuksien vaalimista. Beagleja on käytetty yleisesti myös lääketieteellisissä laboratoriokokeissa sekä käyttäytymis- ja kehitystutkimuksissa niiden pienen koon ja säyseän luonteen vuoksi. (Särmä 2011.) Beaglen säkäkorkeus saa vaihdella välillä 33–40 cm (Suomen Kennelliitto). Värinä hyväksytään kaikki englantilaisperäisen ajokoiran värit paitsi maksanruskea (Särmä 2011). Beagle sijoittui vuonna 2010 sijalle 20 Suomen suosituimpien koirarotujen listalla, rodulla on keskimäärin 600 rekisteröintiä vuosittain (Suomen Kennelliitto 2011).

Koska Suomen nykyinen beaglekanta pohjautuu vain muutamaankin tuontikoiraan, lähtötilanteen suppea koiramäärä näkyy suomalaisten beaglejen aluksi korkeana, mutta nyttemmin laskevana sukusiitosasteena. Nykyään kanta täydentyy kuitenkin lähes vuosittain uusilla tuontikoirilla. Huolimatta siitä, että rodun keskimääräinen sukusiitosaste näyttää olevan pienemässä, on kannasta edelleen huomattava osa sellaisia koiria, joiden sukusiitosaste on vähintään kymmenen prosenttia. Lähes 90 % uroksista on jäänyt 20 vuoden tarkastelujaksona (vuodet 1980–2000) käyttämättä jalostuksessa. Narttujen osalta tilanne on samanlainen; siitokseen käyttämättömien narttujen osuus on tarkastelujakson ajan pysytellyt 75–80 %:n tienoilla. Suomen Beaglejärjestön Jalos-

tusjaosto onkin ylläpitänyt siitosuroslistaa, jonka tarkoituksena on paitsi ohjata astutukset uroksille, joiden voidaan osoittaa olevan metsästysominaisuuksiensa puolesta hyviä yksilöitä, myös tasata jälkeläisten kasaantumista samoilta uroksille. Huomattava osa astutuksista ohjautuukin uroslistalla oleville koirille, mutta listan koirien tasainen käyttö ei ole onnistunut. (Suomen Beaglejärjestö 2009: 6–7.)

4 Taustaa follikulaaridysplasiasta ja glaukoomasta

4.1 Follikulaaridysplasia

Follikulaaridysplasia eli mustan karvatupen kasvuhäiriö (kuva 5) on perinnöllinen sairaus, ja sen oletetaan periytyvän autosomaalisesti ja resessiivisesti (Schmutz ym. 1998: 645). Se aiheuttaa karvojen harvenemista ja haurastumista tyypillisesti korvissa, selässä ja kyljissä. Oireet voivat edetä jopa lähes täydelliseen kaljuuntumiseen kyseisillä ihoalueilla. Muita iho-oireita ei yleensä ole ja koira voi muuten hyvin. (Lohi 2009.) Follikulaaridysplasia liittyy vain mustaan karvoitukseen kaksi- tai kolmivärisillä koirilla (Knottenbelt & Knottenbelt 1996: 476), kuten salukeilla, jackrussellinterriereillä, isomünsterinseisojilla ja sekarotuisilla (von Bomhard ym. 2006: 182). Suomalaisista roduista sairautta esiintyy esimerkiksi suomenajokoirilla. Tauti ilmaantuu koiralle yleensä 2–4 vuoden iässä (Lohi 2009), joskus jopa ensimmäisten elinviikkojen aikana (Welle ym. 2009: 76). Oireiden vakavuus vaihtelee yksilöstä toiseen, samoin niiden alkamisikä. Diagnoosi tehdään usein pelkkien kliinisten oireiden perusteella, mutta varman diagnoosin takaa vain kudoksenäyte. (Welle ym. 2009: 76, 79.)



Kuva 5. Vasemmalla näkyy tyypillinen karvojen harventuminen follikulaaridysplasiaa sairastavalla yksilöllä. Oikealla terve koira. (von Bomhard 2006: 184)

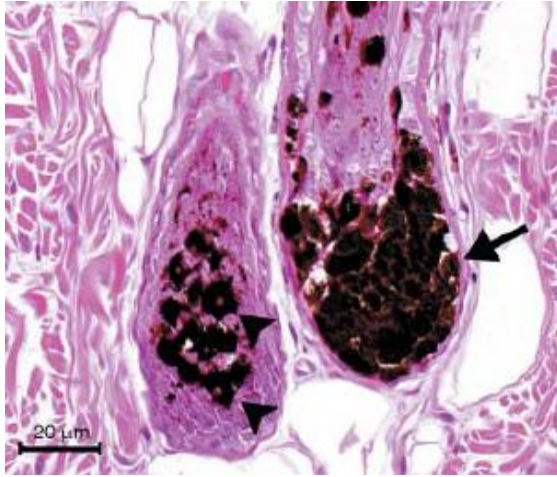
Turkin värin laimentumisen (kuva 6) on todettu altistavan erityyppisille karvan lähtöä aiheuttaville sairauksille. Turkin värin laimentuminen on pigmentaation fenotyyppi eikä siis varsinainen sairaus, jota esiintyy koirilla ja muillakin nisäkäslajeilla. Toisin kuin follikulaaridysplasia, turkin värin laimentuminen vaikuttaa muunkin väriseen karvaan kuin mustaan. Turkin värisävy on tuolloin vaaleampi kuin normaalisti. Jos turkin värin laimentumisen lisäksi esiintyy epänormaalia karvanlähtöä tai jopa karvattomia ihoalueita, on kyseessä värin laimentumisen alopekia (*color dilution alopecia, CDA*). Toinen ihosai-

raus, jolle turkin värin laimentuminen altistaa, on follikulaaridysplasia. (Drögemüller ym. 2007: 468; Welle ym. 2009: 75.) Tämä havaittiin, kun osalla tutkittavista koirista, jotka ilmensivät turkin värin laimentumista, esiintyi myös värin laimentumisen alopekiä tai follikulaaridysplasia. Kudosnäytteitä tutkittaessa selvisi, että värin laimentumisen alopekiä on hyvin samankaltainen follikulaaridysplasian kanssa; molemmissa nähdään samanlaisia pigmenttikasaumia sairaassa ihossa ja karvassa. (Carlotti 1990: 43.) Follikulaaridysplasiaan tosin ei liity aina turkin värin muutosta.



Kuva 6. Vasemmalla turkin värin laimentumista ilmentävä dobermanni, oikealla normaali yksilö. (Philipp ym. 2005)

Turkin värin laimentuminen johtuu geenivirheestä, jonka seurauksena melanosomien kuljetus ihossa ja karvassa on liian vähäistä. Tämä puolestaan johtaa suuriin pigmenttikasaumiin karvan varressa, karvatupessa ja/tai ihossa (kuva 7). (Laffort-Dassot ym. 2002: 253.) Melanosomit ovat melaniinia eli tummaa pigmenttiä sisältäviä soluliman jyväsiä, jotka syntyvät melanosyyteissä. Melanosyytit ovat ihossa esiintyvä solutyyppejä, jonka tehtävä on tuottaa melaniinia sekä siirtää sitä karvoihin ja ihon eri osiin pitkien haarojensa avulla, jolloin karvat ja iho saavat tumman sävyn. (Nienstedt ym. 2000: 95; Solunetti 2006.) Tämä kuljetussysteemi häiriintyy turkin värin laimentumisessa. Melanosyyttien määrä on suunnilleen sama ihon- ja turkinväristä riippumatta, mutta niiden tuottoisuus on suurempaa tummaihoisilla ja -turkkisilla (Nienstedt ym. 2000: 95).



Kuva 7. Värjätty kudoksenäyte follikulaaridysplasiaa sairastavan koiran ihosta. Kuvassa näkyy kaksi karvatuppea, joissa on kasaantunutta melaniinia melanosyyteissä (nuolenkärjet) ja solujen ulkopuolella (nuolet). (von Bomhard ym. 2006: 184)

Turkin värin laimentumista aiheuttava geenivirhe jäljitettiin koiran kromosomiin 25 ja siellä koodaamattoman eksonin 1 viimeiseen nukleotidiin (Drögemüller ym. 2007: 468). Kyseessä on mutaatio *MLPH*-geenissä (*MLPH melanophilin*; melanofiliini). Mutaatiota osattiin etsiä juuri tästä geenistä, koska tiedettiin, mitkä geenit johtavat normaalin turkinvärin eri variaatioihin. Nämä geenit, *MYO5A*, *RAB27A* ja *MLPH*, osallistuvat pigmenttijyvästen tasaiseen jakautumiseen, kuljetukseen sekä sijoittumiseen ihossa ja karvasa. *MLPH*-geenin ero kahteen muuhun väriä säätelevään geeniin on se, että mutaation *MLPH*-geenissä ei tiedetä aiheuttavan mitään muita oireita (Philipp ym. 2005.) Lisäksi *MLPH*-mutaatio on havaittu useilla erierotuisilla koirilla, jotka ilmentävät turkin värin laimentumista (Drögemüller ym. 2007: 468).

Löydetty mutaatio *MLPH*-geenissä on yhden emäksen muutos, jossa G-nukleotidi muuttuu A:ksi; *MLPH* c.-22G>A (Drögemüller ym. 2007: 470). c.-22 indikoi SNP:n tarkkaa paikkaa geenissä: tässä se on 22. nukleotidi alkaen koodauksen aloittavasta ensimmäisestä ATG-kodonista ylävirtaan. Kodonit ovat kolmen peräkkäisen emäksen jaksoja mRNA:ssa (*messenger ribonucleic acid*, lähetti-ribonukleiinihappo). Ne määräävät proteiinisynteesissä käytettävät aminohapot. Kuvassa 8 on koiran *MLPH*-geenin mRNA-sekvenssi eli siitä on jo poistettu proteiinia koodaamattomat intronit.

GCGCTCAGCC	TGGCCCGGCG	CATCCTGCGT	CGCCCCAGTG	CGCCCGGACC	50
GACGCCCGCG	CTGCTCGOCT	TCCTTCCOCT	GTAGGACCGG	AGAGAGCAGC	100
CCCAGGGGCA	GGGCCAGGGC	CTGCCCGCCC	CGGGAAGGA	GCCGTGTGA	150
TCCTGACAA	CAGCAATGG	GAAAAACTG	GATCTTCCA	AGCTCACGGA	200
CGAAGAGGCC	AAGCACGTCT	GGGAAGTGG	TCAGCGGGAC	TTTGACCTGA	250
GAAAGAAAGA	AGAGGAACGA	tTGGAGGGGT	TGAGGGCAA	GATTAAGAG	300
GAAAGCTCCC	AGCGGGAGCT	GCTTGGCGAC	TCCGCGCACC	TGAATGAGAC	350
CCACTGTGCC	CGCTGCCTGC	AGCCTACCG	GCTTCTGyTG	ACCCOCAA	400
GGCAATGCCT	GGACTGTCAC	CTCTTCAOCT	GCCAAGACTG	CAGCCAAGCC	450
CACCCGGAGG	AGCAGGGCTG	GCTtTGCGAC	COCTGCCACC	TGGCCAGAGT	500
TGTGAAGATC	GGCTCGGTAG	AGTGGTACCA	CAAGCAOCTG	AGGGCCOCT	550
TCAAGCGGTT	CGGGAGTGCC	AAGGTGATCC	GGTCCCTGTG	CGGACGGCTG	600
CAGGGTGACG	GTTCGCCTGA	CAGCAtGCGC	AGCTCGOCTG	ACAAOCCACG	650
TGGCCCGGAG	CGAAGTCTCG	CGGAGGGAG	TGGAGACAGT	GAACAGACAG	700
ATGAGGATGG	AGAACTGGGC	ACAGTGGCCC	AGGCCOAGCC	OCTCGGCAGC	750
ACAAAAAAGC	GCCTCTOCTT	CCACGACTTG	GACTTTGAGG	CAGACTCTGA	800
CGACTCCACT	TGGTCTGGAA	GTCACCCOCC	CCACTCGTCC	CCAGTCTCAG	850
TGGCCACAGA	CAGCCTGCAG	GTCCCGTGTG	CCOAGGCOCT	CACGCATGGT	900
CCTCGTGCAG	AGGACGOCTC	CCAGGAGGCC	GCCGTCCTGG	AGGAGGCGGA	950
TGTGTATGCC	GCTGGGTGCC	GTGGGCATCC	AGAAGAGCAG	ATGGACAGCC	1000
TCTCACCTGC	CGGACGGGAC	GCCCTCGCCG	AGCCOCTGCCT	CCCTCGGGGG	1050
TCCTGCACGA	CAGCCGCAGC	TGGGACGCAC	GCCATCGGGA	GGGAGCCOCT	1100
COGCTCCCAG	CATCTGGCCG	ACGGGGACAT	CTCCGTCTCC	GAAGACGAGG	1150
GCACGGGGGC	TCGGGGCACC	ACCTCTCAGC	ATCCOOGAAG	GGGAGGCCAC	1200
ACTCCGGCTG	AGAGCCAGTG	TCTCGCCGGC	CGCGAGCCCA	CcGAAGCCGA	1250
CAGAGAAGAG	GAGACCCTCA	GGAGgaaGT	GGAGGAGCTG	ACCTGCOCGG	1300
TCAGTGACCA	GGACGCCTCG	TCCGAGGAGG	CGGGGAGCGA	GGAGGAAGGG	1350
TCAGACCTGG	CCAGGAGCCC	CTCCTCGCAG	GACCTCOCOG	GGGACGCCCC	1400
aGAGGTGTGC	GCGGCTGCGG	GCCAAACGCA	CGGACGGGAC	ACGACCCOCT	1450
GGGGCCCTCA	GGACCTCGTG	CAGCCCGCCA	GGACCAAGA	CGAGGAGCTG	1500
CTGCAGCTGG	AGGACAGAGT	GGCCCTGACG	GCOCTGTGAGG	TCCAGCAGGT	1550
GGAGAGCGAG	GTGTCCAACA	TCAAGTCCAA	GATTGCGGCC	TTGCAGGCTG	1600
CGGGCTCAC	GGTGAAGCCC	TGGGGGAGC	CCGGGAGGAA	GTCOAACCTC	1650
COGATATTTC	TTCCCGGACT	TGCTGGGAGT	TACGACCAGA	GGCCTAAGGA	1700
TCCGAATGCA	GAGCCTTCGG	ACGAGGTGAC	TGCGOCTAT	CTCCTCAGAA	1750
GGAAAGTTCAG	TAATTCTCCG	AAAAGCCAA	GTAGAGCCGC	CGACTCTGCT	1800
CGGCCGTCCG	CGTCAAGCTA	CCGGGATCC	CTGACGCAGA	GGAAOCCCAA	1850
CAGCAGGAAG	GGGGTGGCCG	CCCACAGCTT	CGCAAGCCT	GTGATGACCC	1900
AGCAGCCCTG	A				

Kuva 8. Koiran melanofiiniin geenin mRNA-sekvenssi. Punaisella korostettu G-nukleotidi on SNP:n paikka ja vaaleanpunaisella on korostettu koodauksen aloittava ATG-kodoni. (Muokattu lähteestä www.ncbi.nlm.nih.gov)

Mutantti A-alleelin osoitettiin vähentävän silmukointitehoa (Drögemüller ym. 2007: 468–470). Silmukointi on prosessi geenin transkription ja translaation välissä, jossa geenistä poistetaan sekvenssit, jotka eivät vaikuta proteiinin sekvenssiin. Geenivirhe altistaa myös follikulaaridysplasialle, mutta sairauteen liittyy todennäköisesti muitakin muokkaavia tekijöitä. Koska follikulaaridysplasiaa esiintyy monilla roduilla, on kyse vanhasta mutaatiosta. (Welle ym. 2009: 79.)

Schmutz ja Berryere tutkivat myös *RAB27A*-geenin osallisuutta follikulaaridysplasiaan isomünsterinseisojalla ja värin laimentumisen alopekiaan italianvinttikoiralla (Schmutz & Berryere 2007: 547). *RAB27A*-geeni vaikuttaa yhdessä *MLPH*-geenin kanssa ihon pigmentaatioon, ja mutaatioiden *RAB27A*-geenissä tiedetään aiheuttavan ihmisillä tiettyä albinismia (Strom ym. 2002: 25423). Geenistä ei kuitenkaan löytynyt muutoksia sairailta koirilla (Schmutz & Berryere 2007: 547).

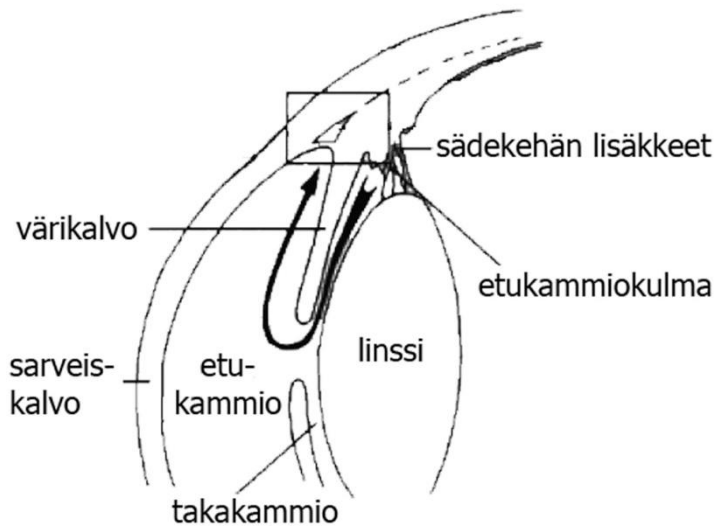
Suomen Ajokoirajärjestö suoritti 1990-luvun alussa suuren kyselytutkimuksen suomenajokoirien omistajille koskien ruokintaa, liikuntaa, terveyttä ja mahdollista kuolin-syytä. Kyselyyn vastasi reilu tuhat omistajaa. Ilmeni, että ihosairaudet olivat suurin yksittäinen sairausryhmä, joka oli aiheuttanut koiran lopetuksen. (Suomen Ajokoirajärjestö 2005.) Karvaton iho on hyvin altis pakkaselle ja auringolle (Philipp ym. 2005), ja koska kyse on pääasiassa metsästyskoirista, jotka viettävät usein suurimman osan elämästään ulkona, ihosairaudet ovat vakavasti otettava riski. Rodulle asetettu jalostus-tavoite onkin säilyttänyt nykyinen tilanne muiden kuin ihosairauksien ja lonkkadysplasian suhteen. Ihosairauksia oli 7 %:lla kyselyyn osallistuneista suomenajokoirista, tavoitteenä olisi saada laskettua luku 4–5 %:iin. (Suomen Ajokoirajärjestö 2005.) Tähän toivo-taankin kehittyvää geeniteknologiaa avuksi.

4.2 Glaukooma

Glaukooma eli silmänpainetauti on näköhermon sairaus, joka johtuu silmän verkkokal-von gangliosolujen etenevästä surkastumisesta. Gangliosolut ovat yksi verkkokalvon solutyypeistä, joista aksonit eli viejähaarakkeet lähtevät näköhermoon. Gangliosolujen rappeutuminen johtaa näköhermon rappeutumiseen. Jos lisäksi kammionesteen tuo-tossa ja sen ulosvirtauksessa on häiriöitä, kuten usein glaukoomassa on, syntyy kam-mionesteen tuoton ja ulosvirtauksen välille epätasapainoa, ja silmänpaine nousee. Täl-löin sairaus on hyvin kivulias. (Ahonen 2011.) Silmänpaineen nousun seurauksena sil-män eri osat, erityisesti näköhermon pää ja verkkokalvo, saattavat vaurioitua. Hoita-mattomana tauti aiheuttaa sokeuden, joten nopea hoitoon pääsy on ensiarvoisen tär-keää. (Elberkennou 2007; Jalomäki & Anttila 2001: 281.)

Primaarisesta eli ensisijaisesta glaukoomasta puhutaan, kun glaukooma ei ole seuraus-ta muusta silmä- tai yleissairaudesta (Elberkennou 2007; Jalomäki & Anttila 2001: 283). Se on perinnöllinen sairaus, joka johtuu verkkokalvon gangliosolujen rappeutumi-sesta sekä mahdollisesti sarveiskalvon ja pupillin välisen etukammion kulman sekä säde-kehäsyvennyksen rakenteellisista poikkeavuuksista (Ahonen 2011). Nämä rakennevir-heet estävät kammionesteen normaalin ulosvirtauksen (kuva 9), jolloin silmänpaine nousee. (Jalomäki & Anttila 2001: 283; Kuchtey ym. 2011.) Avokulmaglaukoomassa kammionkulma on normaali (Ahonen 2011). Kammionestettä erittyy koko ajan taka-kammioon, josta sitä siirretään etukammioon pupillin kautta, ja sitä poistetaan silmästä etukammion kulmasta lähtevien aukkojen kautta. Kammionesteen paineen ansiosta sil-

mämuna saa muotonsa ja sen välityksellä silmän eri osat saavat ravintonsa. (Nienstedt ym. 2000: 501–502.) Primaarinen avokulmaglaukooma on yksi yleisimmistä sokeuden aiheuttajista sekä koirilla että ihmisillä (Jalomäki & Anttila 2001: 281; Kuchtey ym. 2011).



Kuva 9. Koiran silmän kammionesteen normaali virtaus. (Muokattu lähteestä Jalomäki & Anttila 2001: 282)

Alkuvaiheessa koiran glaukooma voi olla lähes oireeton. Tällöin pupilli on normaalia hieman laajempi ja voi esiintyä sarveiskalvon lievää samentumaa sekä silmän lievää punoitusta. Nämä oireet jäävät usein koiran omistajalta huomaamatta, jolloin hoitoon pääsy viivästyy ja sairaus pääsee pahenemaan. Seuraavassa vaiheessa silmänpaine nousee yllättäen; pupilli on selvästi laajentunut, silmä on hyvin punainen, sarveiskalvo on samea, esiintyy lievää mulkosilmäisyyttä sekä verkkokalvon ja näköhermonpään muutoksia. (Jalomäki 2010.) Tärkein diagnostinen toimenpide epäiltäessä glaukoomaa on molempien silmien silmänpaineiden mittaaminen. Toinen tärkeä toimenpide on gonioskopia eli etukammion kulman tähytys, jolla tutkitaan etukammion kulman rakennetta. Glaukoomaan ei ole tehokasta hoitoa, ja usein koirat eivät edes vastaa hoitoon; glaukoomahoito onkin pääasiassa sokeutumisen hidastamista. Kivunlievitys ja silmän paineen alentaminen lääkityksellä ovat tärkeimmät hoitokeinot. (Jalomäki & Anttila 2001: 281, 283–284.)

Koirilla primaarista avokulmaglaukoomaa eli POAG:tä (*primary open angle glaucoma*) aiheuttava geenivirhe on paikallistettu beagleilla. Sairauden tutkimiseksi perustettiin beaglekolonia, koska rodulla esiintyy luonnostaan edellä mainittua sairautta. Useam-

man sukupolven astutuskokeet glaukoomaa sairastavilla beagleilla osoittivat, että POAG periytyy todennäköisesti autosomaalisesti ja resessiivisesti. (Kuchtey ym. 2011.)

Beaglen kromosomista 20 löytyi 4 000 emäksen laajuinen alue, joka kytkeytyi glaukoomaan ja sisälsi glaukooman aiheuttavan geenivirheen (Kuchtey ym. 2011). Kytken-täanalyysi perustuu geenimarkkereihin, jotka todennäköisemmin kuin muut alleelit pe-riytyvät yhdessä sairauden aiheuttavan geenivirheen kanssa (Twyman 2003). Kandi-daattigeenivertailussa taas verrattiin löydettyä geenialuetta ihmisen geenialueen kans-sa, jonka tiedetään säätelevän silmänpainetta. Koiran POAG-lokuksen eli alueen kro-mosomissa geenien lukumäärä ja järjestys oli vastaava kuin ihmisen silmänpainetta säätelevän geenialueen. (Kuchtey ym. 2011.)

Beaglejen glaukooman aiheuttava geenivirhe sijaitsee *ADAMTS10*-geenissä (*ADAM me-tallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10*) eksonissa 17, kohdassa 56 097 365; *ADAMTS10* 56097365 G>A. Tässä SNP:n tarkka paikka on ilmoitettu ge-nomisen referenssisekvenssin mukaan. Tämä G-nukleotidin muuttuminen A:ksi aiheut-taa sen, että glysiinin sijaan koodataan arginiini. Glysiini-aminohappo sijaitsee valmiissa proteiinissa kohdassa 661, joka on proteiinin rakenteessa jyrkässä kaarteessa. Tämän perusteella voidaan olettaa, että glysiiniä tarvitaan proteiinin laskostumiseksi oikeaan muotoon. Näin ollen gly661arg-muutos häiritsisi *ADAMTS10*-geenin normaalia raken-netta. Gly661arg-mutanttin huomattiinkin hajoavan nopeammin kuin normaalin *ADAMTS10*-proteiinin, jolloin sitä on myös vähemmän kudoksessa kuin normaalia pro-teiinia. (Kuchtey ym. 2011.) Kuvassa 10 on koiran *ADAMTS10*-geenin mRNA-sekvenssiä mutaatiokohtineen.

```

CGGTGATGCT GCCCAGGCTG TGAACAGGGG AGGCGGTGCT GTGGGGCTG 50
CCGGCAGCCG GGGCTGGAGA GAGACATGT GACACGTGGC CTCTGGCT 100
CCCCCCTGCC AGATCCTCCG CTGGGCCCTC ACCCTGGGGC TGGGCCTCAC 150
ATTGGAAGTC ATACATGCC TCCGGTCTCA AGATGAGTT C CTGTCCAGTC 200
TGGAGAGCTA TGAGATCGCC TTCCCCA CTC GAGTGACCA CAATGGGGCA 250
CTGCTGGCCT TCTCACCCTC GGCTCCCCGG AGGCAGCGTC GGGGCACAAG 300
GCCAACGACA GAGTCCCGCC TCTTCTACAA GGTGGCTGCA CCAGCACCC 350
ACTTCCTGCT GAACCTAAC CGCAGCCCTC GCCTTCTAGC AGGGCACGTC 400
TCCGTGGAGT ACTGACACG GAGAGGGCTG GCGTGGCAGA GGGCTGCCCG 450
GCCCACTGCT CTCTACGCC GCCACTT GCA GGGCCAGGCC GGAGCTCCC 500
ACGTGGCCAT CAGCACCTGT GGGGGCTGCT ACGGCCTGAT CGTGGCAGAT 550
GAAGAAGAAT ATTTGATCGA GCCCCTGCAA GGTGGGCCCA AAGGGGCCCA 600
GGGCCAGAG GAGAGTGGCC CCATGTGGT GTACAAGCGC TCCTCTGTC 650
GTCACCCCA CCTGGACACA GCCTGTGGAG TGAGAGACGA GAAACCGTGG 700
AAGGGCGGC CTGTTGGCT GCGCACCTG AAGCCGCCAC CTGCCAGGCC 750
CCTGGGAAT GAAACAGAGC GTGGCCAGCC AGGCCTGAA CGCTCGGTCA 800
GCCGAGAGCG CTACGTGGAG ACCCTGGTGG TGGCCGACAA GATGATGGT 850
GCCTACCAG GGCGCCGAGA CGTGGAA CAG TACGTGCTGG CCATCATGAA 900
CAATGTGGC AAACCTTTC AGGACTCGAG TCTGGGAAA ATCGTTAATA 950
TCCTGGTGAC ACGCTCATC CTGCTCAGG AGGACCAGCC CACCCTGGAG 1000
ATCACCCACC ACGCCGGGAA GTCCCTGGAC AGCTTCTGTA AGTGGCAGAA 1050
ATCCATCGT AACCGCAGCG GCCATGGCAA CGCCATTCCG GAGAACGGTG 1100
TGGCCAACCA TGACACAGCG GTGCTCATCA CGCGCTATGA CATCTGCATC 1150
TATAGGAACA AACCTGTGG CACTCTAGGC CTGGCCCCCG TGGGTGGGAT 1200
GTGCGAGCGC GAGCGGAGCT GCAGCATTAA CGAGGACATC GGCCCTGGCA 1250
CCGCCTTCAC CACTCGCCAT GAGATTGGAC ACACGTTTGG CATGAACCAC 1300
GACGGCGTGG GCAACAGCTG CGGGGCCCGC GGCCAGGACC CGGCCAAGCT 1350
CATGGCCGCC CACATCACCA TGAAGACCAA CCCTTTCGTG TGGTCACTCT 1400
GCAGCCGCGA CTACATCACC AGCTTTCGTG ACTCGGGCCT GGGGCTGTGC 1450
CTGAACAACC GGCCCCCAG ACAGGACTTC GTGTACCCAA CGGTGGCACC 1500
TGGCCAGGCC TATGACGAG ATGAACAGTG CCGCTTCAA CATGGAGTCA 1550
AATCGCGTCA GTGTAATAC GGGGAGGTCT GCAGCGAGCT GTGGTGTCTG 1600
AGCAAGAGCA ACCGGTGCAT CACCAACAGC ATTCCAGCCG CCGAGGGCAC 1650
GCTGTGCCAG CACTGACACA TCGACAAGG GTGGTGTAC AAGCGCGTGT 1700
GTGTCCCTT CGGGTCGCGC CCGGAGGGCG TGGACGGGGC CTGGGGCCC 1750
TGGACCCCGT GGGGCGACTG CAGCCGGACG TGGCGCGCGC GCGTGCTCTC 1800
CTCCAGCCG CACTGCGACA GCCCCAGGCC AACCAATCGGA GGCAAGTACT 1850
GCCTGGGTGA GAGGCGGCGA CACCGCTCT GCAACACCGA CGACTGTCCC 1900
CCAGGCTCCC AGGACTTCA GGAATGCG TGCTCTGAA TTGACAGCGT 1950
CCCCTTCCGT GGAATAATT ACACGTGGAA GACCTACCGA GGAGGGGGCG 2000
TGAAGGCCTG TTCACTACA TGCTGGCCG AAGGCTTCAA CTCTACACG 2050
GAGAGGGCAG CGGCCGTAGT GGACGGACA CCCTGCCGCC CCGACACAGT 2100
GGACATTTGT GTCAGTGGCG AGTGCAAGCA TGTGGGCTGT GACCGGGTCC 2150

```

Kuva 10. Koiran *ADAMTS10*-geenin mRNA-sekvenssiä, katkaistu loppupäästä. SNP-kohta on punaisella korostettu G-nukleotidi ja korostettu ATG-kodoni aloittaa koodauksen. (Muokattu lähteestä www.ncbi.nlm.nih.gov)

Terveen koiran silmässä *ADAMTS10*-proteiinia tuotetaan runsaasti kammiokulmassa olevassa huokoisessa kudoksessa, jonka aukkojen kautta kammioneste kulkee. *ADAMTS10*-proteiini kuuluu metalloproteiinaasien ryhmään, joka vaikuttaa soluvälialueen säätelyyn. Tämän vuoksi sekä häiriö proteiinin toiminnassa että gly661arg-mutantti nopeampi hajoaminen voisi aiheuttaa lisääntyneitä vastustusta kammionesteen virtaamisessa edellä mainitussa kudoksessa, josta on seurauksena POAG. Tarkkoja mekanismeja, jotka lisäävät kammionesteen virtauksen vastustusta, ei kuitenkaan vielä tunneta kunnolla. (Kuchtey ym. 2011.)

Kuchteyn tutkimusryhmä määrittä tutkimuksessaan myös POAG:tä aiheuttavan geenivirheen kantajafrekvenssin normaalissa beaglepopulaatiossa. Geenivirhettä etsittiin 48 terveestä koirasta, jotka eivät olleet mitään sukua kolonian koirille. Vain yhdeltä näistä

koirista löytyi sairausalleeli heterotsygoottisena, muilla oli normaali alleeli homotsygoottisena. Tästä voitiin arvioida geenivirheen kantajafrekvenssiksi noin yksi prosentti yhdysvaltalaisessa beaglekannassa. (Kuchtey ym. 2011.) Beagle on varsin terve rotu, jonka yleisimmät sairaudet ovat piilokiveksisyys, purentaviat sekä nikamien ja välilevyjen vauriot. (Särmä 2011.) Glaukooma ei ole beaglejen isoin ongelma suomalaisessa populaatiossa. Suomen Kennelliiton ylläpitämässä KoiraNet-jalostustietojärjestelmässä (<http://jalostus.kennelliitto.fi/>) ei ole ainuttakaan glaukoomaa sairastavaa beaglea (tilanne 27.4.2011), mutta koska kyse on usein sokeuttavasta sairaudesta, voitaisiin geenitestillä varmistaa sairauden pysyminen poissa. Glaukooman tyyppirotuja ovat esimerkiksi amerikancockerspanieli, basset hound, chow chow, shar pei, kettuterrieri ja bostoninterrieri (Gelatt 2007: 15).

5 Geenitestit

5.1 Geenitestien hyödyt ja ongelmat

Koirilla tunnetaan noin 500 periytyvää tai osittain periytyvää sairautta (Mäki 2007), ja joka vuosi tunnustetaan viidestä kymmeneen uutta sairautta (Patterson 2000: 3). Sairausten aiheuttava geenivirhe on selvitetty näistä hieman yli sataan (Mäki 2007), mikä mahdollistaa geenitestin kehittämisen sairauksille. Geneettisten sairauksien diagnosointiin ja kantajatestaukseen tehdyt luotettavat ja tarkat laboratoriotestit ovat tärkeä keino vähentää sairauksia rotupopulaatioissa (Bell 2011: 235). Testejä on tällä hetkellä saatavilla kuitenkin vain pieneen osaan periytyvistä sairauksista, ja näistä melkein kaikki ovat yksinkertaisesti periytyviä: sairautta aiheuttaa virhe yhdessä geenissä. (Mäki 2007.)

Ensimmäinen sairautta aiheuttavan geenivirheen paikantaminen koiralla tapahtui vuonna 1989, jolloin kehitettiin kyseiseen sairauteen myös ensimmäinen geenitesti. Kyseessä oli verenvuototauti hemofilia B cairnterriereillä. (Evans ym. 1989: 10095.) Geenitestejä on nykyään olemassa yli 40 sairaudelle koirilla, mutta koska geenitutkimusta tehdään maailmalla monessa eri paikassa ja yhä kiihtyvällä tahdilla, saatavilla olevien testien lista elää ja kasvaa koko ajan (Mäki 2007). Kaupallisia geenitestejä tarjoavat lukuisat laboratoriot ympäri maailman. Tunnetuimpiin kuuluvat muun muassa englantilainen Animal Health Trust (www.aht.org.uk) ja silmäsairauksien geenitesteihin erikoistunut yhdysvaltalainen Optigen (www.optigen.com).

Suuri osa koirien perinnöllisistä sairauksista periytyy autosomaalisesti ja resessiivisesti (Patterson 2000: 4). Kantajat ovat ilmeisesti joko terveitä tai niillä on vain lieviä oireita, jolloin näiden ei usein tiedetä kantavan sairautta aiheuttavaa mutaatiota, ellei niitä astuteta toisen kantajan kanssa, jolloin syntyy sairaita homotsygoottisia jälkeläisiä (Mäki 2007). Geenitestin avulla voidaan selvittää koiran genotyyppi eli se, onko koira kyseisen geenivirheen suhteen normaali, kantaja vai sairas. Testaamalla jalostukseen käytettävät koirat voidaan välttää astuttamasta kahta kantajaa tai kantajaa ja sairasta, sillä usein perinnölliset sairaudet puhkeavat vasta myöhäisemmällä iällä. Näin estetään sairaiden pentujen syntyminen ja mahdollistetaan kantajien säilyttäminen jalostusohjelmassa, jolloin saavutetaan laajempi jalostuspohja ja säilytetään populaation monimuotoisuus. (Lohi 2009.)

Sairauksien mahdollisimman aikainen tunnistaminen on tärkeää myös ennaltaehkäisevän hoidon kannalta. Esimerkiksi lonkkanivelen kasvuhäiriötä aiheuttavien geenivirheiden tunnistava testi mahdollistaisi lonkkavialle alttiiden koirien hoidon ja ruokinnan suunnittelun jo pentuna mahdollisimman hyvin nivelten tervettä kehitystä tukevaksi. Geenitestistä on hyötyä myös silloin, kun useampi sairaus aiheuttaa samanlaisia kliinisiä oireita: testi paljastaa varmuudella, mistä sairaudesta on kyse. (Mäki 2007.)

Yhteen mutaatioon perustuva testi ei kuitenkaan välttämättä ole riittävä kaikkien rodun yksilöiden testaamiseen. Vaikka onkin todennäköistä, että samanrotuisilla yksilöillä, joilla on samat kliiniset oireet ja laboratoriolöydökset, on sama geenivirhe yhteisen geenipoolin takia, ei näin kuitenkaan aina ole. Geeneissä tapahtuu koko ajan spontaaneja mutaatioita, ja mitä isompi populaatio rotu on, sitä todennäköisemmin useampi kuin yksi mutaatio aiheuttaa saman geneettisen sairauden. (Patterson 2000: 6.) Toisaalta myös yhden geenin aiheuttamissa sairauksissa sairailta yksilöillä on toisistaan hyvinkin poikkeavia oireita. Tämä johtuu sekä ympäristön että muiden geenien vaikutuksesta, sillä monogeenisissäkin sairauksissa muiden geenien vaikutus on läsnä, vaikeivät ne varsinaista sairautta aiheuttaisikaan. (Weatherall 2000: 1120.) Kaikkia koiran, tai ihmisen, resessiivisesti periytyviä geneettisiä sairauksia ei myöskään ole tutkittu tarpeeksi biokemiallisella ja molekyyllitasolla, jotta sairauden aiheuttava geeni olisi selvillä. Laboratoriotestin kehittäminen diagnoosia ja kantajatestausta varten vaatii yleensä kyseessä olevan geenin ja sen proteiinituotteen identifioimisen. (Patterson 2000: 6.)

Monitekijäiset geneettiset sairaudet, kuten esimerkiksi autoimmuunisairaudet ja syövät, muodostavat merkittävän osan koiran periytyvistä sairauksista. Moniin näistä liittyy useita altistavia geenejä, ja osaan vaikuttaa lisäksi ympäristö. Kun tutkimuksissa saavutetaan lisää tietoa monitekijäisten tautien takana olevista geeneistä, voi olla mahdollista tunnistaa mutaatioita olennaisissa geeneissä, joilla on suurempi vaikutus sairauden syntyyn kuin muilla geeneillä. Tämä voisi johtaa edelleen geenitestien kehittymiseen. Todennäköisesti tulee kuitenkin kulumaan kauan aikaa, ennen kuin monitekijäisten tautien tutkimus tuo tietoa, jota voidaan käyttää hyväksi luotaessa tehokkaampaa geenitestausta. (Patterson 2000: 6.) Ongelmana on, ettei tarpeeksi suurivaikutteisia geenejä ole kaikissa sairauksissa. Myös geenien erilaiset vaikutustavat lisäävät monen geenin välityksellä periytyvien sairauksien monimutkaisuutta. Joissain sairauksissa vaikuttavia geenejä on niin monta, että yksittäisten geenivaikutusten arviointi on mahdo-

tonta. Kaikkiin monitekijäisen periytymismallin luonne- ja terveysominaisuuksiin ei testejä ole ehkä mahdollista kehittää ollenkaan. (Mäki 2007.)

5.2 Geenitestien menetelmät

5.2.1 DNA-mutaatiotestit

DNA-mutaatiotestejä sanotaan myös suoriksi testeiksi, sillä ne testaavat suoraan mutaatiokohtaa (Mäki 2007). Ne sopivat geneettisten sairauksien diagnosoimiseen ja kantajatestaukseen roduilla, joilta mutaatio on tunnistettu DNA-sekvenssitasolla. Mutaation havaitsemiseen perustuvat geenitestit ovat kaikista yleisimpiä, ja menetelmiä on monia erilaisia (Eng & Vijg 1997: 424). Kaupallisia mutaatiotestejä ovat muun muassa skotlanninterriereiden von Willebrandin taudin testi (Venta ym. 2000: 10) ja walesincorgien verkkokalvon asteittaista surkastumaa (*progressive retinal atrophy*, PRA) testaava testi (Petersen-Jones ym. 1999: 1637). Mutaatioita voidaan hakea esimerkiksi tavallisella nukleotidisekvensoinnilla, reaaliaikaisella PCR:llä, jossa käytetään spesifistä TaqMan-kemiaa, tai mikrosiruteknologian avulla, joka on uusin tulokas geeniteknologiassa. Mikrosiruteknologian käyttö yleistyy koko ajan. Se perustuu oligonukleotidisiruihin, joiden avulla voidaan analysoida valtava määrä DNA-fragmentteja rinnakkain. Ideaalisti tekniikka toimii niin, että tutkittavat DNA-sekvenssit kiinnitetään pienelle, lasiselle mikrosirulle, jonka jälkeen sekvenssejä sovitetaan yhteen eri varianttien kanssa hybridisaatioanalyysissä. (Eng & Vijg 1997: 424.) DNA-hybridisaatio tarkoittaa toisiaan vastaavien yksijuosteisten DNA-fragmenttien yhdistymistä kaksijuosteiseksi emäspariutumisen kautta. Hybridisoitumisaste ilmoittaa samankaltaisuuden. Mikrosirutekniikka mahdollistaa isojen geenien tai useampien geenien monistamisen ja analysoimisen yhtä aikaa (Eng & Vijg 1997: 425).

Suurimpia haittoja mutaatiotesteissä on se, että mutaatiotestien kehittämiseksi paremmaksi tarvitaan tutkimustyötä, joka on aikaa vievää ja kallista. Lisäksi yhdelle rodulle suunnattu testi ei yleensä sovi muille rotujen välisten geneettisten erojen takia. Tässä voi kuitenkin olla poikkeuksia tapauksissa, joissa testattavilla roduilla on yhteiset esivanhemmat. (Patterson 2000: 5–6.) Lisäksi suorakaan geenitesti ei ole 100-prosenttisesti luotettava. Jos samaa sairautta aiheuttaa rodussa usea mutaatio tai usea geeni, olisi kaikki mutaatiot ja geenit tunnistettava ja niille kaikille kehitettävä testi. Voi

olla vaikeaa, tai jopa mahdotonta, selvittää, kuinka monta mutaatiota tai merkkigeeniä tietyssä rodussa esiintyy. (Mäki 2007.)

5.2.2 DNA-markkeritestit

DNA-markkeritestit perustuvat aikaisemmin mainittuun kytKentäepätasapainoon, jossa sairausalleeli ja markkerialleeli sijaitsevat kromosomissa niin lähellä toisiaan, että ne periytyvät yhdessä eikä väliin osu rekombinaatiota. Markkeritesti tunnistaa siis vain yhteyden tietyn merkkigeenin ja sairautta aiheuttavan geenin välillä (Mäki 2007). Käytännössä siis testattavan yksilön, sen sisarusten ja vanhempien DNA-näytteistä etsitään sairauden aiheuttavan geenilokuksen lähistöllä olevia toistuvia markkereita (Gupta ym. 2003: 208), jotka ovat usein mikrosatelliitteja. Mikrosatelliitti on DNA:n lokus, joka koostuu 1–6 emäsparin toistojaksoista. Niitä käytetään ihmispuolella tyypillisesti esimerkiksi populaatiogeneettisissä tutkimuksissa sekä rikostutkinnassa ja isyystestauksessa. (Goldstein ym. 1995: 463.)

Markkeritestit ovat usein kalliimpia kuin mutaatiotestit ja vievät enemmän aikaa, koska ne saattavat vaatia markkerin määrittelyn sekä vanhemmissa että jälkeläisissä. Markkeritestit ovat käyttökelpoisia vain, jos markkerit ovat polymorfisia eli niistä on vähintään kaksi eri variaatiota. (Patterson 2000: 6.) Tuolloin toinen niistä voidaan yhdistää sairaiisiin yksilöihin ja toinen terveisiin.

Markkeria voidaan käyttää testaamiseen, vaikka geeniä ei tunneta tarkemmin. Testit eivät myöskään välttämättä ole rotukohtaisia, vaan niitä voidaan käyttää erituisilla koirilla. (Patterson 2000: 6.) Vaikka markkeritestejä voidaan käyttää osana kantajien testauksessa, ne eivät ole usein yhtä luotettavia kuin mutaatiotestit. Tämä johtuu siitä, että rekombinaatiota voi tapahtua markkerin ja sairausgeenin välillä; mitä kauempana markkeri on sairauden aiheuttavasta lokuksesta, sitä suurempi todennäköisyys rekombinaatiolle on, ja sitä todennäköisemmin eläimiä luokitellaan väärin. (Bell 2011: 234.) Joissain tapauksissa markkeritestillä terveeksi luokitelluista jalostukseen suunnitelluista koirista suositellaan otettavaksi vielä kudoksenäyte, kuten esimerkiksi munuaisien kehityshäiriötä (*renal dysplasia*, RD) testaavan markkeritestin jälkeen. Se on ainoa tapa selvittää varmasti, onko koira sairas vai ei, koska sairauden tarkka periytymismuoto ei ole vielä tiedossa. (Mäki 2007.)

5.2.3 Geenituotetestit

Geenituotetestit mittaavat geenien proteiinituotteiden määrää tai toimintaa tai molempia. Geenituotetestit antavat luotettavan vastauksen autosomaalisissa sairauksissa, joissa on entsyymaattisia puutteita, silloin, kun koira on homotsygoottinen sairas yksilö. Testeissä on se hyöty, etteivät ne ole mutaatiospesifisiä, jolloin niitä voidaan käyttää roduilla, joilla on eri mutaatio samassa geenissä, vaikkei sairautta kyseisellä rodulla oltaisikaan vielä tutkittu. Suurin haitta geenituotetesteissä on se, ettei niiden avulla aina havaita kantajia kunnolla, koska heterotsygoottien testiarvoilla on taipumusta päällekkäisyyteen normaalien kontrollien kanssa. Toinen haitta testissä on se, ettei tutkittavan geenin tuottamaa proteiinia välttämättä tuoteta sellaisessa kudoksessa, josta voitaisiin ottaa näyte elävästä eläimestä. Tällaisia ovat esimerkiksi silmäsairaudet. (Patterson 2000: 5.) Toimiva geenituotetestit on kehitetty muun muassa jo aikaisemmin mainittuun hemofilia B:hen; verestä tutkitaan koagulaatiofaktori IX:n määrää, joka on alhainen sairailta yksilöillä (Herzog ym. 1999: 56).

6 Tutkimusmenetelmät

6.1 Näytteiden valinta

Tätä työtä varten valittiin tutkimusryhmän 671 suomenajokoiranäytteestä (tilanne 16.3.2011) kaikki kymmenen yksilöä, joilla eläinlääkäri oli diagnosoinut follikulaaridysplasian. Sairaus oli diagnosoitu vähintään kliinisten oireiden perusteella, yhdeltä koiralta oli otettu myös ihonäyte patologin tarkastettavaksi. Lisäksi analyysihin otettiin viisi muuta yksilöä, joiden diagnoosi perustui omistajan follikulaaridysplasiaepäilyihin oireiden perusteella. Näiden viiden koiran epävarma diagnoosi oli otettava huomioon tulosten analyyseissä. Yhteensä DNA-näytteitä oli siis 15.

Kontrolleiksi valittiin 15 suomenajokoira, joilla ei ollut merkitty follikulaaridysplasiaa tutkimusryhmän tietokantaan (tilanne 16.3.2011) ja joiden ikä oli vähintään kolme vuotta, jotta mahdollinen sairaus olisi jo ehtinyt näkyä. Terveiden kontrollikoirien sukulaisuussuhteet sairaisiin yksilöihin ja muihin kontrolleihin selvitettiin kolmanteen sukupolveen asti. Lista sairaista ja kontrollikoirista löytyy liitteestä 1.

Glaukoomatutkimuksen tavoitteena oli laskea tutkimusryhmän 177 suomalaisesta beagle-äytteestä (tilanne 6.4.2011) glaukoomaa aiheuttavan geenivirheen kantajafrekvenssi. Millään näistä beagleista ei ole todettu glaukoomaa tutkimusryhmän tietokannan mukaan (tilanne 6.4.2011). Koska tutkimuksiin haluttiin myös koiria, joilla on diagnosoitu glaukooma, mukaan valittiin kolme norjanharmaahirvikoiranäytettä sekä kolme basset hound -näytettä glaukoomaa sairastavista yksilöistä. Samanrotuisten sairaiden yksilöiden ottaminen mukaan olisi luonnollisesti paras vaihtoehto, mutta koska suomalaisia beagleja, joilla olisi glaukooma, ei ollut tiedossa, toimittiin näin. Tämä oli otettava huomioon tulosten analyyseissä. Sairaiden yksilöiden näytteille valittiin kontrolleiksi samanrotuisten terveiden koirien näytteet. Sukulaisuussuhteet voitiin jättää tässäkin kokonaan huomiotta.

6.2 DNA:n eristäminen ja puhdistaminen

Geenitutkimuksissa tarvittavaa DNA:ta voidaan eristää erilaisista näytteistä: verestä, kudoksista, poskisoluista, syljestä sekä karvoista tai hiuksista. Parhaiten ja puhtainta DNA:ta saadaan kuitenkin verinäytteestä. Molempia töitä varten eristettiin tarvittavat

DNA:t pakastetuista kokoverinäytteistä Chemagenin Chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I) -laitteella. Se on pitkälle automatisoitu DNA:n ja RNA:n eristyslaite, jolla yhdellä eristysajolla voidaan käsitellä jopa 96:ta näytettä. Osa DNA-näytteistä oli jo valmiiksi eristettynä pakastimessa, tutkimuksia varten eristettiin yhteensä noin 2/3 kaikista tarvittavista 219 DNA-näytteestä.

Chemagic MSM I:n suorittama eristys perustuu magneettipartikkelimenetelmään, jossa magneettipartikkelit on päällystetty DNA:ta sitovalla päällysteellä. Magneettipartikkelien avulla DNA saadaan eroteltua verinäytteen muista komponenteista ja DNA saadaan pestyä epäpuhtauksista, jotka mahdollisesti häiritsisivät erotusta seuraavia laboratoriomäärityksiä. Eristysajossa verinäytteen solut ensin hajotetaan valmistajan omalla hajotuspuskurilla, minkä jälkeen näytteeseen viedyt magneettipartikkelit tarttuvat näytteen DNA:han. Seuraavassa vaiheessa sähkömagneettinen metallisauva kerää DNA:han tarttuneet magneettipartikkelit seuraavaan putkeen, ja suoritetaan monivaiheiset pesut. Pesujen jälkeisessä viimeisessä vaiheessa DNA eluoidaan eli liuotetaan pois magneettipartikkeleista, jolloin saadaan puhdistettua DNA:ta sisältävä liuos, jota voidaan käyttää tutkimuksen seuraavissa vaiheissa. (Chemagen Biopolymer-Technologie Aktiengesellschaft.) Myös eluointiliuos on laitteen valmistajalta tilattava liuos, jonka koostumusta ei kerrota.

6.3 DNA-pitoisuuksien määrittäminen ja DNA-laimennosten tekeminen

Eristetyn ja puhdistetun DNA:n pitoisuus eluointiliuoksessa mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä. Mittausmenetelmä perustuu DNA:n nukleotidien absorptioon 260 nanometrissä. Tuloksena saadaan DNA:n pitoisuus nanogrammina mikrolitrassa eluointiliuosta. NanoDropin kaltaiset pienoislaitteet ovat erittäin käteviä, mutta lopputulosta voi vääristää moni tekijä, kuten esimerkiksi tuotteen epäpuhtaudet. (Suominen ym. 2010: 110–111.)

Seuraavia laboratorioanalyysyjä varten suomenajokoirien follikulaaridysplasianäytteet laimennettiin pitoisuuteen 10 ng/μl ja beaglejen glaukoomanäytteet pitoisuuteen 20 ng/μl. Laimennokset tehtiin Sigma-Aldrichin BPC (*Biotechnology Performance Certified product line*) Grade -veteen.

6.4 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

6.4.1 PCR-alukkeiden suunnittelu

Alukkeiden suunnittelu on yksi PCR:n tärkeimmistä vaiheista. Turkin värin laimentumista käsittelevästä artikkelista saatiin suoraan alukkeiden sekvenssit, joita tutkijat olivat käyttäneet (Welle ym. 2009: 76). PCR:llä oli monistettu 312 bp:n (*base pair*, emäspari) fragmenttia, joka sisälsi koiran *MLPH*-geenin eksonin 1. Käytetyt alukkeet olivat 5'-CCTTCCTCCCCTGTAGGAC-3' ja 5'-GCCTAAAATGAGCTCCCTGA-3'. Ensimmäinen aluke on forward-aluke (F-aluke), joka tarttuu templaattiin ennen kopioitavaa aluetta, 3'-puolelle emäsjärjestyksen mukaisesti. Jälkimmäinen aluke taas on reverse-aluke (R-aluke), joka tarttuu saman templaatin vastinjuosteeseen vastaavalla periaatteella. Ennen alukkeiden tilaamista artikkelissa ilmoitetut alukesekvenssit vielä tarkistettiin virheiden välttämiseksi. NCBI:n (The National Center for Biotechnology Information) Internet-sivuilta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) etsittiin koiran melanofiliinigeeni ja sen mRNA-sekvenssi. Sekvenssi vietiin UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Bioinformatics -Internet-sivuille (<http://genome.ucsc.edu/>), joilta BLAST-hakukonetta käyttämällä haettiin mRNA-sekvenssille vastine koiran kromosomista 25, jossa geeni sijaitsee. Näin saatiin visualisoitua *MLPH*-geenin eksoniset ja introniset alueet. UCSC:n Internet-sivuilla on myös PCR-toiminto, jolla voi tarkastaa alukkeiden monistaman DNA-jakson, joka todettiin oikeaksi ja aluketilaus tehtiin Sigma-Aldrichille.

6.4.2 PCR:n suoritus

Tilatut alukkeet liuotettiin ensin Tris-EDTA-puskuriin, jonka jälkeen ne laimennettiin vedellä 5 µM:ksi. Esimerkiksi R-aluketta oli 54,7 nmol kuivajauheena, jolloin se liuotettiin 547 µl:aan Tris-EDTA-puskuria. Tästä seoksesta otettiin 25 µl laimennosta varten ja lisättiin 475 µl vettä. PCR-reaktioseos (taulukko 1) tehtiin eppendorffputkeen, josta se pipetoitiin kuoppalevyille.

Taulukko 1. PCR-reaktioseos. Reagenssien tilavuudet ovat yhdelle kuoppalevyn kaivolle.

Mastermix (Biotoools)	Pitoisuus	Tilavuus (μ l)
puskuri 10x (sisältää MgCl 2 mM)		2
dNTP (deoksinukleotidit)	10 mM	0,4
F-aluke	5 μ M	2
R-aluke	5 μ M	2
polymeraasientsyymi	5 U/ μ l	0,2
templaatti-DNA	10 ng/ μ l	2
H ₂ O		11,4
Lopputilavuus		20

Ennen varsinaista PCR:ää tehtiin testi-PCR yhdelle DNA-näytteelle, jotta nähtiin toimivatko alukkeet valitulla PCR-ohjelmalla. PCR-ohjelmaksi valittiin perusohjelma (taulukko 2) ja se suoritettiin Certified GeneToolin valmistamalla MJ Thermal Cycler PTC-225 -PCR-laitteella. Kun PCR:n ja alukkeiden toiminta oli testattu ja todettu hyväksi, kuoppalevylle pipetoitiin ensin 18 μ l Mastermixiä kaikille 30 näytteelle ja yhdelle kontrollinäytteelle, jossa olivat alukkeet, mutta ei DNA-templaattia. Templaatin sijasta laitettiin ionivaihdettua ja autoklavoitua vettä. Vesikontrollin avulla voitiin selvittää, onko esimerkiksi jokin reagenssi kontaminoitunut.

Taulukko 2. PCR-ohjelma. Vaiheita 2–4 toistettiin 34 kertaa.

Vaihe	Lämpötila	Aika	
1.	95 °C	5 min	alkudenaturaatio
2.	95 °C	30 s	denaturaatio
3.	60 °C	30 s	alukkeiden kiinnittyminen
4.	72 °C	45 s	pidennysreaktio
5.	72 °C	10 min	loppupidennysreaktio
6.	8 °C	-	loppulämpötila

6.5 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

PCR:ssä syntynyt tuote tarkastettiin agarosigeelielektroforeesilla eli AGE:llä. Se on yksinkertainen ja tehokas menetelmä erikokoisten DNA-jaksojen erottamiseen ja tunnistamiseen (Suominen ym. 2010: 123). Tarkastus tehdään, jotta nähdään, onko tuotetta ylipäättään syntynyt. Siinä nähdään myös, onko vesikontrolliin syntynyt tuotetta,

jolloin kyseessä on DNA-kontaminaatio. Kontaminaatiota voi tulla esimerkiksi huolimattomasta näytteiden käsittelystä tai kontaminoituneista pipeteistä. Jos kontaminaatiota ilmenee, pitää PCR ajaa uudestaan uusilla alukelaimennoksilla ja PCR-reaktioseoksella.

Nukleiinihappojen kulkeutuminen AGE:ssä perustuu niiden sähkövaraukseen ja kokoon. Nukleiinihapot ovat negatiivisesti varautuneita, jolloin ne kulkevat sähkövirrassa elektroforeesilaitteen positiivista napaa kohti. Agarosigeelin verkkomainen rakenne hidastaa nukleiinihappojen geelissä kulkeutumista sitä enemmän, mitä isompia fragmentit ovat. Pitkät DNA-molekyylit kulkeutuvat siis hitaammin kuin lyhyet. Erikokoiset DNA- (tai RNA-) jaksot erottuvat ajon aikana omiksi vyöhykkeikseen. Lopputuloksena on kullekin jaksolle oma vyöhyke. (Suominen ym. 2010: 123.)

Eroteltujen nukleiinihappojen visualisointiin käytettiin GelRed-väriainetta (Biotium), joka voidaan lisätä suoraan geeliin sen valmistusvaiheessa. Väriaine sitoutuu emäsparien väliin ja fluoresoi ultraviolettivalossa oranssinpunaisena. Taulukossa 3 näkyvät työssä valmistettuun 1-prosenttiseen agarosigeeliin käytetyt kemikaalit ja niiden määrät.

Taulukko 3. 1-prosenttisen agarosigeelin valmistus.

0,5 x TBE-puskuri	Agarosi (Bioline)	GelRed-väriaine (Biotium)	Virta
150 ml	1,5 g	7,5 µl	120 V

Geelijaon varten erotettiin jokaisesta näytteestä 5 µl PCR-tuotetta, johon lisättiin 1,5 µl latausväriä (*loading dye*, Fermentas), joka värjää näytteen ja painaa sen kaivon pohjalle. Ensimmäiseen kaivon pipetoitiin 5 µl kokostandardia (Finnzymes) ja seuraaviin kaivoihin PCR-tuotteen ja loading dyen sekoitukset, viimeisenä kontrollinäyte. Kytettiin virta päälle ja annettiin ajon edetä noin 40 minuutin ajan.

6.6 PCR-tuotteen puhdistus

PCR-tuotteelle tehtiin ExoSAP-puhdistus. ExoSAP-puhdistus on nopea entsyymaattinen reaktio PCR-tuotteille, joka eliminoi kiinnittymättömät alukkeet ja nukleotidit. Puhdistus suoritetaan ennen laboratorioanalyysyä, kuten DNA-sekvensointia, jolloin kiinnittymättömät alukkeet ja nukleotidit häiritisivät. Ensin sekoitettiin keskenään 25 µl eksonukleaasia (Fermentas), jonka pitoisuus oli 10 U, ja 100 µl alkalifosfataasia (Fermentas), jonka pitoisuus oli 2 U. 1,5 µl seosta lisättiin 5 µl:aan PCR-tuotetta. Tämän jälkeen ajettiin PCR-laitteella ExoSAP-ohjelma (taulukko 4).

Taulukko 4. ExoSAP-puhdistusohjelma.

Lämpötila	Aika	
37 °C	15 min	entsyymireaktio
85 °C	15 min	denaturaatio
8 °C	-	loppulämpötila

Puhdistettuihin PCR-tuotteisiin lisättiin 1,6 µl F-aluketta sekvensointireaktiota varten. Näytteet toimitettiin kapillaarisekvensointiin, jonka suoritti ostopalveluna Molekyylilääketieteen tutkimusohjelman Sekvensointilaboratorio (SeqLab). Laboratorio huolehti myös sekvensointireaktion tekemisestä.

6.7 Kapillaarisekvensointi

Kapillaarisekvensointilaitteet ovat kapillaarielektroforeesilaitteita, jotka virittävät fluoresoivasti leimatut nukleotidit lasersäteen avulla ja muuttavat saatavat tulokset analysoitavaan muotoon automaattisesti tietokoneohjelmalla. Fluoresoivat värit liitetään emäsiin sekvensointireaktiossa ennen varsinaista sekvensointia. Reaktio tehdään PCR-laitteella, jossa näytteen DNA monistetaan ja leimataan. (Applied Biosystems 2001/2010: 24–25, 36.)

Kun sekvensointireaktio on tehty, laitetaan kuoppalevyllä olevat näytteet kapillaarisekvensointilaitteeseen. Näytteet kulkevat kuoppalevyllä polymeerillä täytettyihin kapillareihin sähkövirran avulla. Kun nukleotidit saavuttavat kapillaarissa olevan detektorikkunan, lasersäde virittää fluoresoivat väriaineet. Väreistä säteilevä fluoresenssi kerätään ja analysoidaan. Leimojen aallonpituudet on värikoodattu lyhimmästä pisimpään: sininen, vihreä, keltainen ja punainen. Sininen vastaa C-nukleotidiä, vihreä vastaa A:ta, keltainen (korvataan tulostuksessa mustalla) vastaa G:tä ja punainen vastaa T:tä. (Applied Biosystems 2001/2010: 35–38.)

6.8 Variant Reporter -tietokoneohjelma

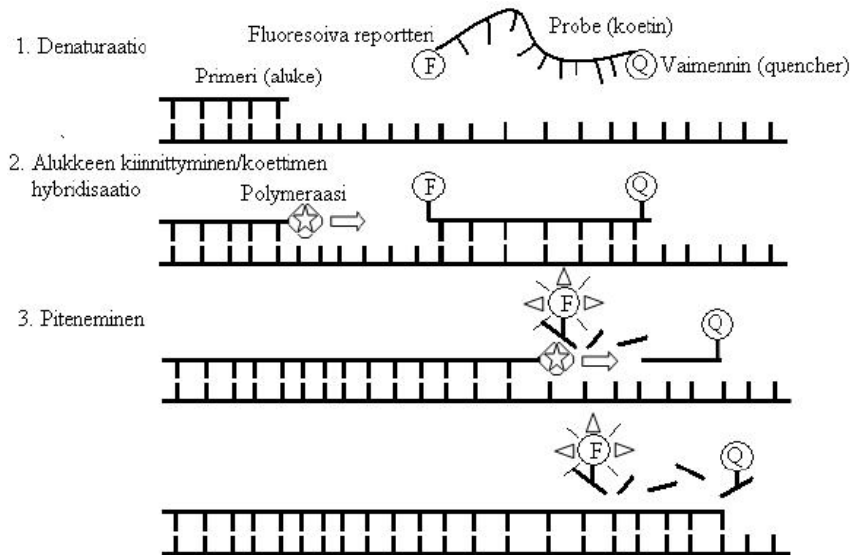
Suomenajokoirien follikulaaridysplasianäytteiden sekvenssit analysoitiin Applied Biosystems Variant Reporter -tietokoneohjelmalla. Ohjelma on suunniteltu geenivarianttien havainnointiin ja raportoimiseen etsittäessä esimerkiksi mutaatioita tai SNP:itä sekvensseistä. Ohjelmaan syötetään käytetyt alukkeet, näytteiden sekvenssit sekä refe-

renssisekvenssi vertailua varten, joka voidaan hakea NCBI:n Internet-sivuilta (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Referenssisekvenssi tässä tapauksessa oli koiran *MLPH*-geenin sekvenssi eksonista 1.

6.9 Reaaliaikainen polymeerasiketjuraktio (RT-PCR)

Beaglejen glaukoomanäytteet monistettiin ja analysoitiin reaaliaikaisella polymeerasiketjureaktiolla, RT-PCR:llä (*Real-Time PCR*). Merkittävin ero perinteiseen PCR:ään verrattuna on mahdollisuus seurata reaktion etenemistä reaaliaikaisesti fluoresoivan merkkiaineen avulla. Hyötynä on myös se, ettei RT-PCR vaadi reaktionjälkeisiä analyysejä, kuten agarosigeelielektroforeesia ja sekvensointia. Tämä nopeuttaa huomattavasti tulosten saamista ja pienentää myös kontaminaatoriskiä.

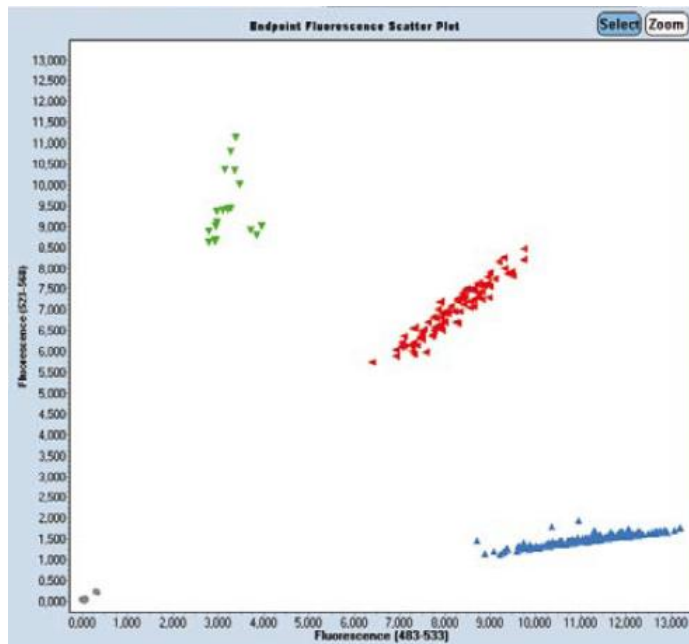
RT-PCR:ssä käytettiin TaqMan-kemiaa, joka perustuu näytteelle spesifisten koettimien käyttöön. Koettimen sekvenssi on vastakkainen kiinnostuksen kohteena olevalle sekvenssille ja sijoittuu suoraan SNP:n päälle. TaqMan-koetin on oligonukleotidi eli muutamien nukleotidien mittainen DNA-pätkä, joka sisältää kaksi erilaista leimaa: fluoresoivan reportterin (*reporter*) ja sammuttajan (*quencher*). Koetin pilkkoutuu samalla, kun polymeeraasi valmistaa PCR-reaktiossa uutta DNA-juostetta (McGuigan & Ralston 2002: 133–134), mutta vain sopivat koettimet pilkkoutuvat (Roche Diagnostics GmbH 2008: 218). Koettimen pilkkoutuessa reportteri ja sammuttaja erkanevat toisistaan, jolloin sammuttaja ei pysty enää vaimentamaan reportterin fluoresoivaa signaalia, kuten se tekee ehjässä koettimessa, ja fluoresenssi vapautuu. Fluoresenssi saadaan aikaan viritämällä leimat valolla. Tämä fluoresenssin lisääntyminen mitataan reaaliajassa ja sen määrä nousee monistusreaktioiden edetessä. (McGuigan & Ralston 2002: 133–134.) Kuvassa 11 on havainnollistettuna TaqMan-kemian toiminta.



Kuva 11. Reaaliaikaisen PCR:n ja TaqMan-kemian toiminta. (Miettinen & Vyhtinen 2009: 14)

TaqMan-menetelmä soveltuu hyvin sellaisten alleelien erotukseen, jotka poikkeavat toisistaan vain yhdellä emäksellä (McGuigan & Ralston 2002: 133). Menetelmää käytetäänkin yleisesti geenitesteissä. Kahden alleelin tapauksessa, kuten tässä työssä, käytetään kahta erilaista koettinta. Koettimet ovat spesifisiä eri alleelivarianteille, villityypille eli normaalille alleelille ja mutaatiolle, ja ne on leimattu eri reporttereilla. Sammuttajien leimat ovat molemmissa samat. PCR:n lopussa fluoresenssispektri kerätään, ja ohjelman algoritmit erottelevat molempien leimojen osuudet spektrissä ja tuottavat niistä hajontakuvaajan (McGuigan & Ralston 2002: 135).

Ajossa voidaan käyttää varsinaisten tutkittavien näytteiden lisäksi negatiivisia kontroleja, kuten tässä työssä tehtiin. Negatiivisina kontrolleina käytettiin kahta näytettä, joihin pipetoitiin DNA:n sijasta vettä, sekä yhtä näytettä, jossa oli pelkkä reaktioseos ilman alukkeita, koettimia sekä vettä. Jos jonkin negatiivisen kontrollin fluoresenssisignaalia ei voi erottaa tutkittavista näytteistä, ohjelma näyttää varoituksen (Roche Diagnostics GmbH 2008: 219). Kuvassa 12 on esimerkki syntyvästä hajontakuvaajasta.

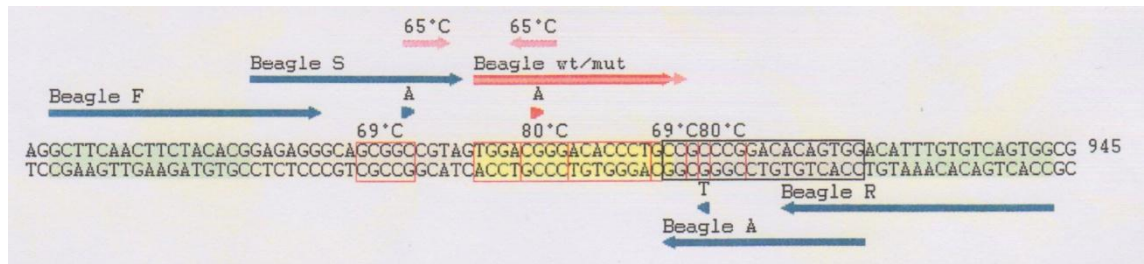


Kuva 12. Hajontakuvaajaan ryhmitellyt genotyypit. Punaiset kolmiot ovat heterotsygoottisia kantajia, vihreät ja siniset kolmiot ovat asetuksista riippuen joko terveitä yksilöitä tai homotsygoottisia sairaita. Negatiiviset kontrollit näkyvät harmaina. (Roche Diagnostics GmbH 2008: 228)

Tulosten analysoinnissa käytettiin loppupisteanalyysiä (*endpoint genotyping analysis*). Menetelmällä voidaan analysoida yksittäisiä SNP:itä hyvin tunnetulla alueella, jossa ei ole odotettavissa tuntemattomia variaatioita. Ohjelma tulkitsee genotyypin mittaamalla kahden leiman fluoresoinnin intensiteetin: villityyppi, heterotsygoottimutantti eli kantaja tai homotsygoottimutantti eli sairaus. Tuloksena saadaan hajontakuvaaja, johon ohjelma ryhmittää samanlaiset signaalit ja automaattisesti tunnistaa genotyypit. (Roche Diagnostics GmbH 2008: 216–218.)

6.9.1 Tarvittavat alukkeet ja koettimet

Alukkeet ja koettimet tilattiin TIB Molbiol Syntheselabor GmbH:sta Saksasta. Laboratorio suunnittelee tutkittavan sekvenssin perusteella neljä aluketta: kaksi F-aluketta ja kaksi R-aluketta. Ne sijoittuvat hieman eri kohtiin sekvenssiä (kuva 13); toinen kummastakin alukkeesta aina vähän lähemmäksi tutkittavaa geenivirhettä ja toinen kauemmaksi. Alukkeet ovat myös erimittaisia. Alukkeista testataan kaikki neljä eri yhdistelmää ja katsotaan, mikä alukepari toimii parhaiten. Taulukossa 5 on lueteltuna kaikki alukkeet sekvensseineen ja sulamislämpötiloineen.



Kuva 13. RT-PCR:ään tilatut alukkeet ja koettimet, ja niiden sijoittuminen sekvenssiin.

Koettimia tehtiin Molbiolilla kaksi erilaista: toinen oli spesifinen mutaatiolle ja toinen villityypille (*wild type*). Koettimet sekvensseineen näkyvät taulukosta 5. Molemmissa koettimissa 3'-pään sammuttajat on leimattu samalla väriaineella, mutta 5'-pään reportterit eri aineilla. Reporttereissa käytettiin FAM:ää eli fluoreseiniä ja YAK:ta eli Yakima Yellowta. FAM on keltainen väri, joka fluoresoi valoa sinisestä vihreään. YAK on dikloori-rodamiini, joka fluoresoi myös valoa sinisestä vihreään. Sammuttajien leima oli BBQ eli BlackBerry Quencher, joka on tumma väri sammuttajille. Sitä voidaan käyttää yhdessä sellaisten reportterien leimojen kanssa, jotka fluoresoivat välillä ultraviolettiaallonpituus - sininen aallonpituus (FAM ja YAK), sekä keltaisesta, oranssista tai punaisesta aallonpituudesta lähi-infrapuna-aallonpituudelle asti. (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH 2008.)

Taulukko 5. RT-PCR:n alukkeet ja koettimet.

Alukkeen nimi		Sekvenssi	Sulamislämpötila (T_m)
Beagle F	F-aluke	5'-GCTTCAACTTCTACACGGAGAGG-3'	58,2 °C
Beagle S	F-aluke	5'-GAGAGGGCAGCGGACGTA-3'	58,8 °C
Beagle A	R-aluke	5'-CCACTGTCCGGTCCG-3'	59,3 °C
Beagle R	R-aluke	5'-CCACTGACACAAATGTCCACTGT-3'	58,6 °C
Koettimen nimi			
Beagle wt	villityyppi	5'-FAM-TGGACGGGACACCCTGC-BBQ	61,0 °C
Beagle mut	mutaatio	5'-YAK-TGGACAGGACACCCTGCC-BBQ	60,0 °C

6.9.2 RT-PCR:n suoritus

Ensin alukkeet ja koettimet liuotettiin Tris-EDTA-puskuriin, jonka jälkeen tehtiin vielä käyttölaimekset. Liuotukset ja laimekset tehtiin TIB Molbiol Syntheselabor GmbH:n ohjeiden mukaisesti kullekin alukkeelle ja koettimelle erikseen. Esimerkiksi Beagle mut -koetin liuotettiin yhteen millilitraan Tris-EDTA-puskuria, jolloin saatiin liuos,

jonka konsentraatio oli 0,031 µg/µl. Tästä tehtiin käyttölaimennos 1:6 ottamalla 10 µl liuosta ja lisäämällä se 50 µl:aan autoklavoitua vettä. Näin saatiin käyttölaimennoksen konsentraatioksi 5 ng/µl. Myös wt-koetin ja alukkeet laimennettiin samaan loppupitoisuuteen. Seuraavaksi tehtiin RT-PCR-reaktioseos (taulukko 6) eppendorfputkeen, josta se pipetoitiin kuoppalevyille.

Taulukko 6. RT-PCR-reaktioseos. Reagenssien tilavuudet ovat yhdelle kuoppalevyn kaivolle.

TaqMan RT-PCR-reaktioseos	Tilavuus (µl)
Probe Master 2x	5
Aluke-koetinseos	2
DMSO	0,25
H ₂ O	1,75
DNA 20 ng/µl	1
Lopputilavuus	10

Aluke-koetinseos tehtiin pipetoimalla yhtä F-aluketta ja R-aluketta sekä kumpaakin koetinta suhteessa 1:1:1:1. DMSO:ta eli dimetyylisulfoksidia lisättiin reaktioseokseen TIB Molbiol Syntheselabor GmbH:n suosituksesta. DMSO auttaa DNA-juosteiden erottumista toisistaan, koska se häiritsee emästen pariutumista sekä tehostaa PCR:ää.

Ensin tehtiin testiajot, jotta saatiin selville paras alukepari. Testiajoissa mukana olivat kolmen glaukoomaa sairastavan norjanharmaahirvikoiran näytteet, niiden kolme kontrollia sekä kaksi vesikontrollia, joissa oli DNA:n sijaan autoklavoitua vettä. Ajot suoritettiin Roche Applied Sciencen LightCycler 480 -laitteella, ajoissa käytetty kaksivaiheinen ohjelma näkyy taulukossa 7.

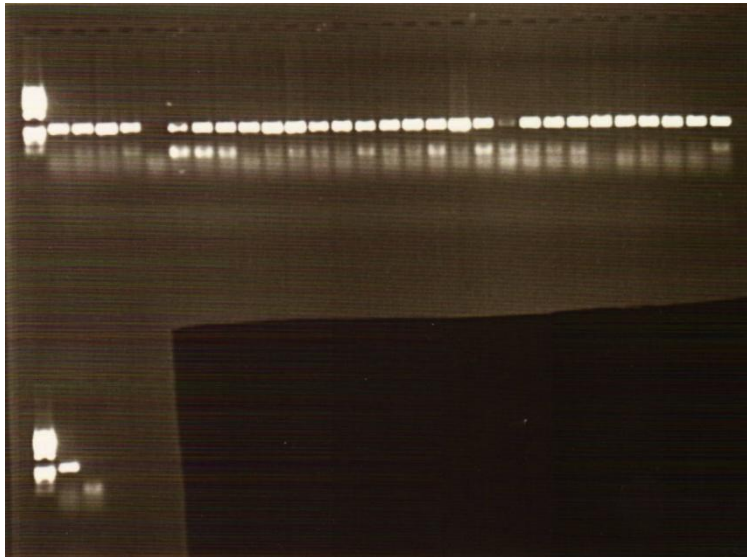
Taulukko 7. RT-PCR-ohjelma. Vaiheita 3 ja 4 toistettiin 45 kertaa.

Vaihe	Lämpötila	Aika	
1.	60 °C	30 s	alkulämmitys
2.	95 °C	10 min	lämmitys
3.	92 °C	15 s	denaturaatio
4.	60 °C	1,5 min	pidennysreaktio
5.	60 °C	30 s	loppulämmitys
6.	8 °C	-	loppulämpötila

7 Tulokset

7.1 Suomenajokoiran follikulaaridysplasia

Suomenajokoirien DNA-näytteistä monistettiin PCR:llä turkin värin laimentumiseen liitetty geenivirhealue, ja ajettiin PCR-tuotteet agarosigeelielektroforeesilla. Kun agarosigeelijaio oli edennyt tarpeeksi pitkään, geelistä otettiin kuva ultraviolettivalossa (kuva 14). Ylä- ja alarivien ensimmäisissä kaivoissa ovat kokostandardit. Kaikissa muissa kohdissa näkyy hyvin onnistunut PCR-tuote (kirkas vyöhyke), paitsi kaivossa kuusi, jossa ei näy tuotetta lainkaan, ja myös kaivo 21 on hyvin himmeä. Alarivin viimeinen kaivo on kontrolli ilman templaattia, josta nähdään, ettei ole syntynyt PCR-tuotetta, kuten ei pidäkään.



Kuva 14. Ultraviolettivalossa otettu kuva agarosigeelielektroforeesilla ajetuista PCR-tuotteista.

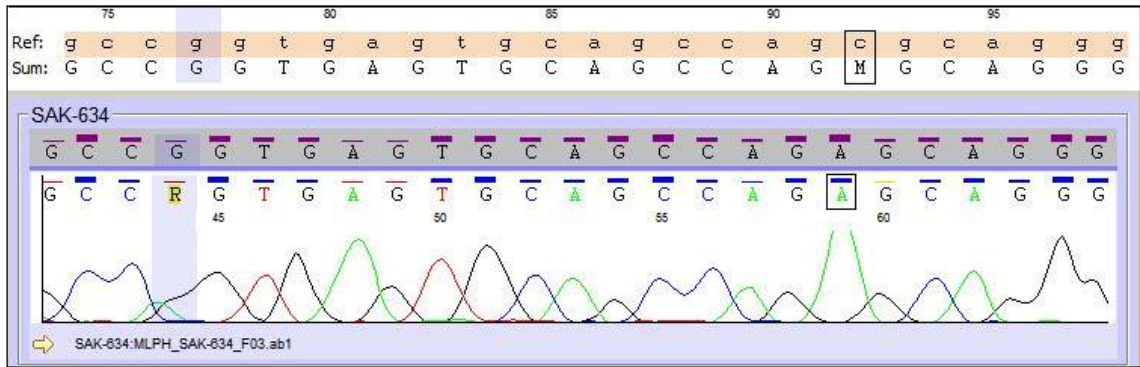
Seuraavaksi tarkastettiin NanoDropilla kaivon kuusi ja 21 sisältämien näytteiden DNA-laimennoksien pitoisuudet. DNA-pitoisuuksien molemmissa laimennoksissa olisi pitänyt olla siis suunnilleen 10 ng/μl. Kaivon kuusi näytteen pitoisuus oli 10,2 ng/μl, kun taas kaivon 21 pitoisuus oli vain 1,1 ng/μl. Tämä voi johtua esimerkiksi pipetointivirheestä, NanoDropin herkkyydestä häiritseville tekijöille tai siitä, että DNA-näytettä oli säilytetty kauan pakkasessa, jolloin sen konsentraatio oli saattanut ajan mittaan muuttua. Tehtiin uusi PCR-ajo kaivon kuusi näytteestä samalla Mastermix-ohjeella ja samalla alukkeiden kiinnittymislämpötilalla. Tällä kertaa tuotetta tuli hyvin. PCR ei aina onnistu joka näyt-

teelle samoista pipetointitekniikoista ja Mastermix-seoksesta huolimatta; tässäkin tapauksessa ei pystytä sanomaan, mikä esti ensimmäisellä kerralla PCR-reaktion toimimisen. Kaivon 21 näytteestä ei tehty uutta laimennosta, jossa olisi ollut tarkasti 10 ng/ μ l DNA:ta, koska alkuperäistä näytettä ei ollut juuri yhtään enää jäljellä.

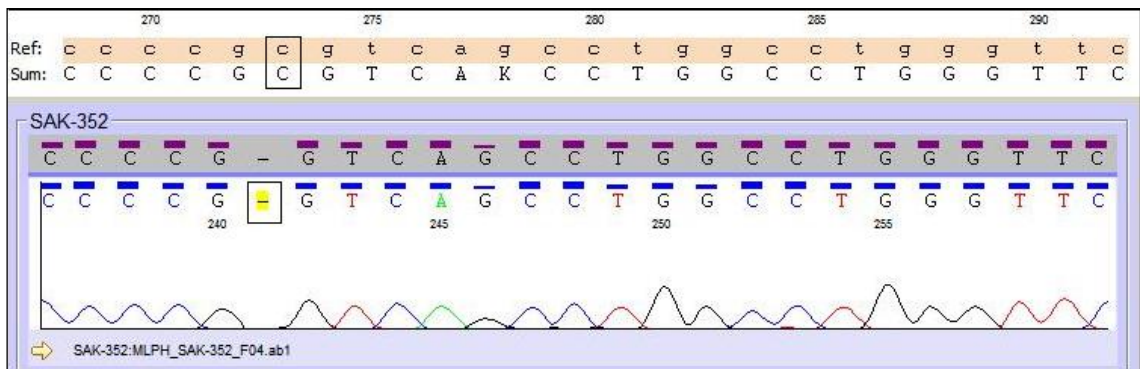
Sekvensoinnin jälkeen tulokset analysoitiin Variant Reporter -ohjelmalla. Väriin laimentumiseen yhdistettyä homotsygoottista c.-22G>A-muutosta ei löytynyt yhdeltäkään suomenajokoiralta, mutta kolmelta koiralta muutos löytyi heterotsygoottisena. Koirat olivat statuksiltaan diagnosoitu sairas, epäilty sairas ja kontrolli. Monistetulta alueelta löytyi myös kolme muutosta intronista, jotka on lueteltu liitteessä 2. Kuvassa 15 on koiran kromosomin 25 sekvenssiä *MLPH*-geenin kohdalta lukien ja löydetty varianttikohdat. Kuvissa 16, 17 ja 18 on Variant Reporter -ohjelman luoma näkymä jokaisesta muutoskohdasta. Lisäksi tutkimukseen valituista kymmenestä eläinlääkäriin diagnosoimasta suomenajokoirasta tehtiin sukupuu, josta näkyvät niiden väliset sukulaisuussuhteet (kuva 19).

aggcgcgccc	ggagctgggc	ggggcgggct	cggcccatgt	gacctgccc	51144437
gcccgcgccc	cgcgcccccc	ccaggtcagg	tgcccgggtgc	cccgcgcccc	51144487
CGCTCAGCC	TGGCCCCGGC	CATCCTGCGT	CGCCCCAGTG	CGCCCCGACC	51144537
GACGCCCCGC	CTGCTGCCT	TCCTTCCCCT	GTAGGACCGG	AGAGAGCAGC	51144587
CCCAGGGGCA	GGGCCAGGGC	CTGCCCGCCC	CGGGAAAGGA	GCCgtgagt	51144637
gcagccagcg	cagggaatgg	ggaggccagg	ggggcgccct	gggactgggc	51144687
accagggcat	aaggagggtc	cacggtgatg	ggtgcagctc	cccccggtgtg	51144737
caagtgcccc	cagcggctcc	caggccttgg	tccaggctgg	tgcagagggc	51144787
actcccttc	ccccaaacac	aggcctcagg	gctaccccg	gtcagcctgg	51144837
cctgggttct	cagggagctc	attttaggca	aaacagtgat	ttcgctcaga	51144887
gccagctgtg	agtcccagtg	tggactgggc	cgaggcttgg	gccaaccag	51144937
cagacacagg	gctagaccgc	ccgggcccaa	ggccatctga	tgaaagtctt	51144987
cacctgcact	gcggtgccga	ttcgggggga	cagagccggg	ctggtgtttt	51145037

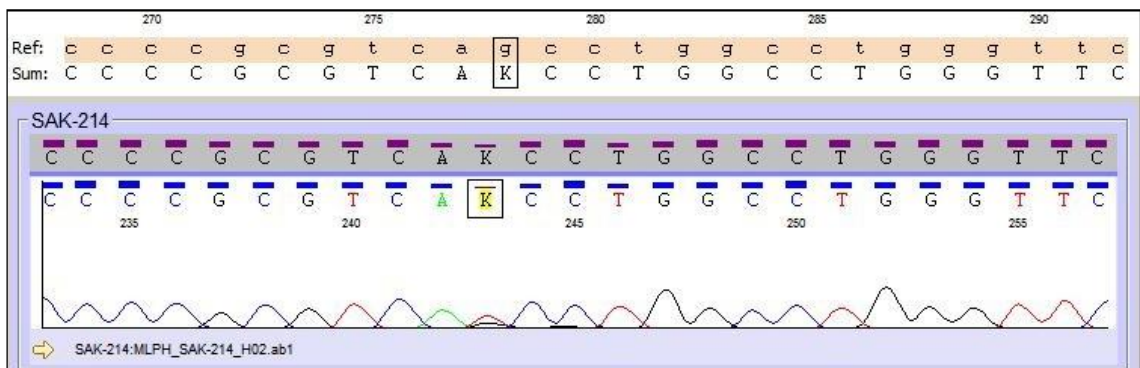
Kuva 15. Koiran kromosomin 25 alkupään sekvenssiä, joka on katkaistu. Isot, siniset kirjaimet ovat *MLPH*-geenin eksoni 1, pienet kirjaimet kuuluvat introneihin. Violetilla korostetut kaksi pitkää aluetta ovat kohtia, joille alukkeet suunniteltiin. Punaisella korostettu G-nukleotidi on turkin väriin laimentumiseen liitetty c.-22G>A-muutoskohta. Loput kolme korostettua kohtaa ovat löytyneitä intronisia muutoskohtia.



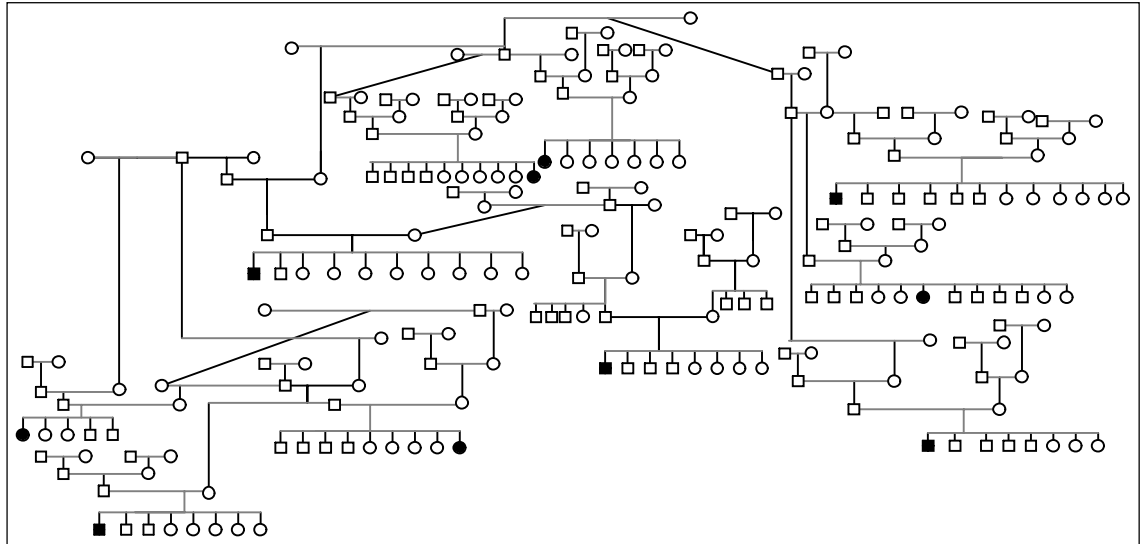
Kuva 16. C-nukleotidien muuttuminen A:ksi reunustettuna kohdassa 92 koiralla numero 15. Sinisellä pohjalla näkyy myös yhden nukleotidin muutos kohdassa 77, joka on siis tarkasteltu *MLPH* c.-22G>A -kohta.



Kuva 17. C-nukleotidien deleetio kohdassa 273 koiralla numero 4.



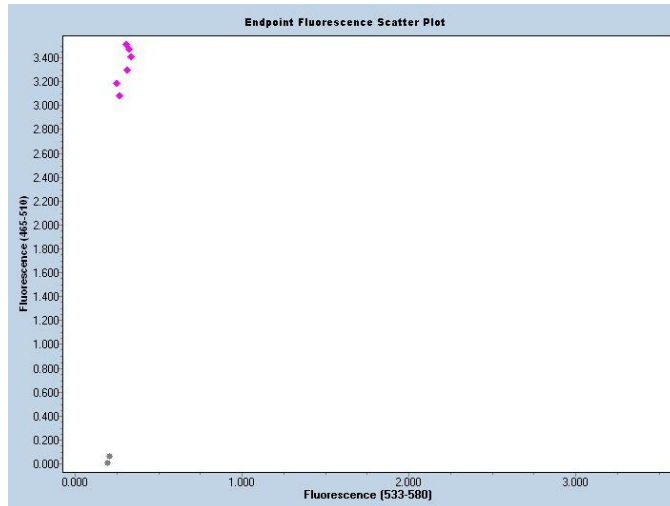
Kuva 18. Toisen G-nukleotidin muuttuminen T:ksi kohdassa 278 koiralla numero 1.



Kuva 19. Sukupuu tutkimuksen kymmenestä suomenajokoirasta, joilla eläinlääkäri oli diagnosoinut follikulaaridysplasian (musta neliö: sairias uros, musta ympyrä: sairias narttu, valkoinen neliö: terve uros ja valkoinen ympyrä: terve narttu).

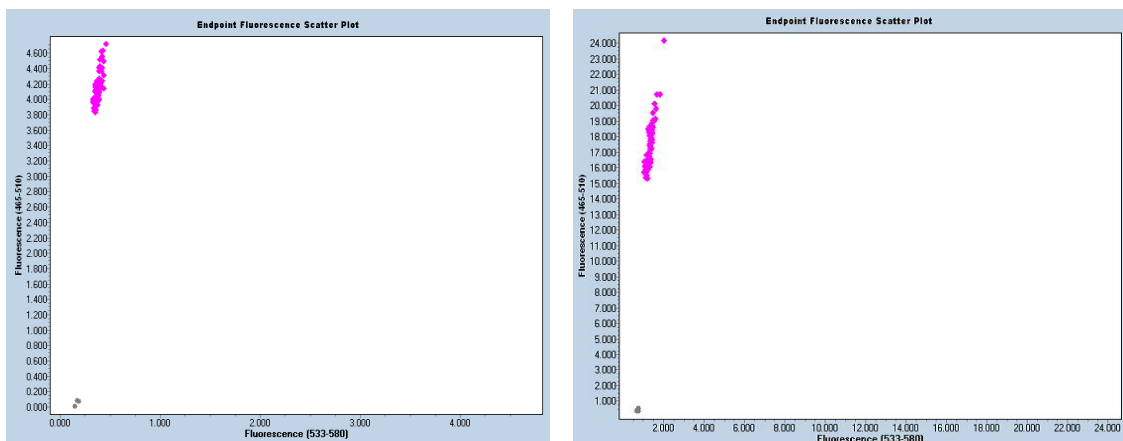
7.2 Beaglen glaukooma

Ennen Beaglejen DNA-näytteiden ajamista reaaliaikaisella PCR:llä ja spesifisellä Taq-Man-kemialla, piti testiajolla selvittää paras alukepari. Testiajossa olivat mukana kolme DNA-näytettä glaukoomaa sairastavista norjanharmaahirvikoirista, niiden kolme tervettä kontrollia sekä kaksi vesikontrollia. Alukepareista paras oli Beagle F - Beagle A, koska niillä vesikontrollit saatiin parhaiten kuvaajaan alas vasemmalle (eivät sisällä DNA:ta) ja DNA-näytteet toisen akselin yläpäähän. Sairaiden koirien tosin olisi pitänyt sijoittua alas oikealle, mutta ne näkyivät terveinä yksilöinä ylhäällä vasemmalla (kuva 20). Tämä voi johtua siitä, että norjanharmaahirvikoirilla glaukooman aiheuttaa mahdollisesti eri geenivirhe kuin beagleilla, tai siitä, että joko alukepari, koettimet tai molemmat eivät jostain syystä toimineet. Testiajolla ei siis saatu selville, toimivatko alukeet ja koettimet, mutta näytteet päätettiin kuitenkin ajaa ja katsoa, mitä tuloksia saadaan.



Kuva 20. Testiajo alukeparilla Beagle F - Beagle A. Kaikki näytteet, myös sairaat yksilöt, näkyvät terveinä villityyppeinä ylhäällä vasemmalla. Vesikontrollit näkyvät harmaina.

Ensimmäisessä RT-PCR-ajossa ajettiin 93 beaglenäytettä ja kolme negatiivista kontrollia (kuva 21). Kaikilla näytteillä oli sama villityypin genotyyppi (terve) eli ei löytynyt yhtään vastakkaista homotsygoottia genotyyppiä (sairas). Ajossa ei saatu näkymään yhtään heterotsygoottista koiraa (kantaja), ne olisivat sijoittuneet kuvaajassa suurin piirtein keskelle ilmentäen heterotsygootteina molempien reportterien leimojen signaaleja. Toisessa ajossa ajettiin loput 84 beaglenäytettä sekä kolme basset hound -näytettä glaukoomaa sairastavista yksilöistä samanrotuisine kontrolleineen. Myöskään näistä näytteistä ei löytynyt yhtään kantajaa.



Kuva 21. Hajontakuvaajat RT-PCR-ajoista. Vasemmalla ensimmäiset 93 näytettä ja kolme negatiivista kontrollia, oikealla loput 84 näytettä sekä kolme näytettä glaukoomaa sairastavista basset houndeista kontrolleineen. Kaikki näytteet näkyvät villityyppeinä punaisella ylhäällä vasemmalla, negatiiviset kontrollit näkyvät harmaina.

8 Yhteenveto

8.1 Tutkimustuloksista

Suomenajokoirilta ei löydetty homotsygoottisena turkin värin laimentumiseen liitettyä muutosta c.-22G>A melanofiliinigeenistä. Kolmelta koiralta (diagnosoitu sairas, epäilty sairas ja kontrolli) muutos löytyi heterotsygoottisena. *MLPH* c.-22G>A -mutaatio on todennäköisesti tapahtunut jo kauan aikaa sitten koiran historiassa, koska se esiintyy yleisesti eri roduissa. Muillakin roduilla esiintyy heterotsygoottisia genotyyppisiä ilman, että heterotsygotiaa olisi yhdistetty mihinkään sairauteen. (Welle ym. 2009: 75, 77.) Mutta on mahdollista, että heterotsygoottisuuskin altistaisi jonkin verran follikulaaridysplasiaalle yhdessä muiden, vielä tuntemattomien, altistavien tekijöiden kanssa. Jatkok tutkimusten kannalta olisi hyvä saada suurempi näytemäärä tutkittavaksi sekä useampia kudoksenäytteen avulla luotettavasti diagnosoituja follikulaaridysplasiatapauksia mukaan.

Tämän perusteella *MLPH* c.-22G>A -muutos voidaan sulkea pois follikulaaridysplasiaa aiheuttavana tekijänä suomenajokoirilla. Nyt löydetty kolme muuta varianttia sijaitsivat kaikki geenin intronissa, jolloin voidaan olettaa, etteivät ne vaikuta syntyvään proteiiniin. Mikään löytyneistä muutoksista ei myöskään ollut sellainen, joka olisi löytynyt vain sairaista yksilöistä, vaan ne löytyivät sekä sairaista että terveistä. Seuraava askel tässä tutkimuksessa olisi sekvensoida kaikki 15 *MLPH*-geenin eksonia ja katsoa, löytyisikö sieltä yhteisiä mutaatioita sairailta yksilöiltä. Kaksi muuta geeniä, joista mutaatio voisi mahdollisesti löytyä, ovat aikaisemmin mainitut *RAB27A* ja *MYO5A*. Ne osallistuvat *MLPH*-geenin tavoin pigmenttijyvästen tasaiseen jakautumiseen, kuljetukseen sekä sijoittumiseen ihossa ja karvassa (Philipp ym. 2005). Geenivirheet *RAB27A*- ja *MYO5A*-geeneissä on ihmisillä liitetty Griscellin oireyhtymään, joka aiheuttaa muun muassa ihon pigmentin vaalenemista. Tässäkin vaaleneminen johtuu melaniinin kuljetuksen häiriintymisestä. (Pastural ym. 1997: 289; Strom ym. 2002: 25423.) Isomünsterinseisojalla ei löydetty yhteyttä *RAB27A*-geenin ja follikulaaridysplasian välillä (Schmutz & Berryere 2007: 547), mutta se ei sulje pois mutaation mahdollisuutta suomenajokoiran tapauksessa.

Jos edellä mainituista geeneistä ei löytyisi yhteistä mutaatiota follikulaaridysplasiatapauksissa, voitaisiin tutkia karvan kasvuun vaikuttavia geenejä. Mutaation esimerkiksi *hr*-geenissä (*hr* *hairless*; karvaton), jota ilmennetään karvatupessa, tiedetään hiirikokeiden

perusteella aiheuttavan karvattomuutta (Cachon-Gonzalez ym. 1994: 7717–7718, 7720). Häiriö *hr*-geenin toiminnassa saattaisi koirallakin näin ollen aiheuttaa ongelmia karvan kasvussa. Geenivirheen suhteen homotsygoottisten hiirten iho on herkkä UV-valolle sekä kemiallisesti aiheutetuille ihokasvaimille, mutta varsinaisiin sairauksiin sitä ei ole hiirillä eikä muillakaan nisäkkäillä liitetty (Cachon-Gonzalez ym. 1994: 7720; Pan-teleyev ym. 2000: 1071). Ihmisillä geenivirhe liittyy perinnöllisiin ja synnynnäisiin hiuksettomuutta aiheuttaviin sairauksiin, joissa voi olla myös muita iho-oireita (Ahmad ym. 1998: 720; Ahmad ym. 1999: 141).

Tulosten tulkinnassa oli otettava huomioon se, että tutkimuksessa mukana olevilta sairailta koirilta vain yhdeltä oli otettu kudospnäyte ihosta, jolloin vain sen follikulaaridysplasiadiagnoosi on varma. Vaikka eläinlääkärit ovat diagnosoineet muillakin yhdeksällä sairaalla follikulaaridysplasian, ovat sairauden oireet kuitenkin hyvin samankaltaiset kuin esimerkiksi atopiassa.

Geenivirheen jäljittämistä saattaisi myös auttaa tieto, mitä geenivirhettä isomünsterinseisojille tarjolla oleva follikulaaridysplasiatesti testaa (HealthGene, <http://www.healthgene.com/canine-dna-testing/test/?tId=1>). Mikäli testissä katsotaan jonkin muun geenin virhettä, voitaisiin tämä testata myös suomenajokoirilta.

Suomalaisista beaglenäytteistä ei löytynyt yhtään glaukoomageenivirheen kantajaa. Kennelliiton tiedoissa ei olekaan yhtään glaukoomaa sairastavaa suomalaista beaglea, jolloin geenivirhettä ei välttämättä esiinny koko populaatiossa. On mahdollista, että yhdysvaltalais tutkimuksessa löydetty geenivirhe on hyvin harvinainen kolonian ulkopuolella; kolonian beagleilla geenivirhettä on rikastettu yli 30 vuotta astuttamalla tarkoituk-sella sairaita koiria keskenään. On myös teoriassa mahdollista, etteivät käytetyt aluk-keet tai koettimet toimi, koska niitä ei saatu testattua kyseistä geenivirhettä kantavilla yksilöillä. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä. Tutkimuksen jatkoa ajatellen olisi olen-naista saada näyte yhdysvaltalaisen beaglekolonian sairaasta yksilöstä sekä kantajasta, jotta voitaisiin olla varmoja testin toiminnasta.

Vaikka tutkimuksissa ei löytynyt etsittyjä geenivirheitä, ne loivat silti hyvän alustan jat-kotutkimuksille. Suomenajokoiran follikulaaridysplasiatutkimuksessa on nyt yksi vaihto-ehdo suljettu pois, ja voidaan jatkaa tarkastelemalla muita geenialueita ja mahdollisesti muita geenejä. Beaglen glaukoomatutkimus vaatii vielä loppuvarmuuden positiivisel-la näytteellä. Tutkimus mahdollistaa myös uusien kandidaattigeenien tutkimisen.

8.2 Tulevaisuuden näkymät

Tietämys koirien geneettisistä sairauksista on lisääntynyt huimaavasti viimeisen 20 vuoden aikana. Uusien löytöjen tahti kiihtyy edelleen. Tiedon lisäämiseksi tarvitaan eläinlääkäreiden, eläinlääketieteen geneetikkojen sekä kasvattajien yhteistyötä. Rohkaiseva merkki positiivisesta kehityksestä on lisääntynyt tietämys ja avoin keskustelu geneettisistä sairauksista kasvattajien kesken. Rotujärjestöt antavat myös oman panoksensa järjestämällä terveystarkastuksia, joilla saadaan selvitettyä kussakin rodussa esiintyviä perinnöllisiä sairauksia. Koirien geenitutkimuksesta saatavat hyödyt tunnustetaan nykyään yleisesti ja geenitutkimusta tuetaan rahallisesti. Geneettisten sairauksien diagnosoimiseen ja kantajatestaukseen tehdyt laboratoriotestit tulevat todennäköisesti olemaan tulevaisuudessa arkipäivää eläinlääkäreiden vastaanotoilla. Geenitestauksesta voi lopulta tulla vaatimus, jotta koira saadaan rekisteröityä ja jotta se saa osallistua näyttelyihin; näin on jo joissain maissa, esimerkiksi Ruotsissa.

Mutta kuten aikaisemmin todettiin, spontaaneja geenimutaatioita tapahtuu koko ajan. Vaikka perinnöllisten sairauksien esiintyvyyttä saadaankin huomattavasti pienennettyä geenitesteillä ja kontrolloidulla jalostuksella, ei niitä saada kuitenkaan kokonaan kitkettyä pois. Uusien, spontaanien mutaatioiden takia voidaan pitkällä aikavälillä odottaa, että ilmaantuu uusia geneettisiä sairauksia. Myös vanhoja, jo tunnettuja sairauksia ilmaantuu uudelleen. (Patterson 2000: 6–7.)

Geenitestejä tulee kehittää ensisijaisesti sairauksiin, jotka haittaavat koiran jokapäiväistä elämää ja tuottavat kipua. Testeistä saadaan paras hyöty, kun ymmärretään testattavien sairauksien tai ominaisuuksien periytymismallit ja niitä säätelevien geenien vaikutustapa sekä testeihin mahdollisesti liittyvät ongelmat tai rajoitukset. Jalostuskarsinnan tarve ja mahdollisuudet on punnittava rotukohtaisesti, ottaen huomioon sekä jalostuspohjan laajuuden että luonteen, terveyden ja toimivan rakenteen. Rodun ollessa tilanteessa, jossa karsinta ei ole mahdollista, mutta vakavia perinnöllisiä sairauksia tai ongelmia kuitenkin esiintyy, on apua haettava roturisteytyksistä (Mäki 2007).

Lähteet

- Ahmad, W., ul Haque, M.F., Brancolini, V., Tsou, H.C., ul Haque, S., Lam, H., Aita, V.M., Owen, J., deBlaquiere, M., Frank, J., Cserhalmi-Friedman, P.B., Leask, A., McGrath, J.A., Peacocke, M., Ahmad, M., Ott, J. & Christiano, A.M. 1998. Alopecia universalis associated with a mutation in the human *hairless* gene. *Science*. Vol. 279, s. 720–724.
- Ahmad, W., Zlotogorski, A., Panteleyev, A.A., Lam, H., Ahmad, M., ul Haque, M.F., Abdallah, H.M., Dragan, L. & Christiano, A.M. 1999. Genomic organization of the human *hairless* gene (HR) and identification of a mutation underlying congenital atrichia in an Arab Palestinian family. *Genomics*. Vol. 56, s. 141–148.
- Ahonen, S. 2011. Tutkija, Koirien geenitutkimusryhmä, Helsingin yliopisto ja Folkhälsan. Keskustelu 16.5.2011.
- Applied Biosystems. 2001/2010. ABI Prism 310 Genetic Analyzer, User's Manual. Verkko-dokumentti. <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041812.pdf>. Luettu 13.5.2011.
- Bell, J.S. 2011. Researcher responsibilities and genetic counseling for pure-bred dog populations. *The Veterinary Journal*. Vol. 189, s. 234–235.
- Bonnett, B.N., Egenvall, A., Olson, P. & Hedhammar, A. 1997. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *Veterinary Record*. Vol. 141, s. 40–44.
- Carlotti, D.N. 1990. Canine hereditary black hair follicular dysplasia and colour mutant alopecia: clinical and histopathological aspects. *Advances in Veterinary Dermatology*. Vol. 1, s. 43–46.
- Chemagen Biopolymer-Technologie Aktiengesellschaft. Automated nucleic acid isolation. Verkko-dokumentti. <<http://www.chemagen.com/chemagic-concept.html>>. Luettu 28.3.2011.
- Cachon-Gonzalez, M.B., Fenner, S., Coffin, J.M. Moran, C., Best, S. & Stoye, J.P. 1994. Structure and expression of the *hairless* gene of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 91, s. 7717–7721.
- Drögemüller, C., Philipp, U., Haase, B., Günzel-Apel, A-R. & Leeb, T. 2007. A noncoding melanophilin gene (*MLPH*) SNP at the splice donor of exon I represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs. *Journal of Heredity*. Vol. 98, s. 468–473.
- Elberkennou, J. 2007. Kohonneen silmänpaineen ja primaarisen avokulmaglaukooman seulonta avohoidossa: yhteenveto tutkimusnäytöstä. Verkko-dokumentti. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos sekä Terveidenhuollon menetelmien arviointiyksikkö. <<http://lib.stakes.fi/ohtanen/tarkastele.aspx?id=421>>. Julkaistu 17.12.2007. Luettu 22.3.2011.
- Eng, C. & Vijg, J. 1997. Genetic testing: The problems and the promise. *Nature Biotechnology*. Vol. 15, s. 422–426.
- Evans, J.P., Brinkhous, K.M., Brayer, G.D., Reisner, H.M. & High, K.A. 1989. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 86, s. 10095–10099.

Galibert, F. & André, C. 2008. The dog: A powerful model for studying genotype-phenotype relationships. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* 3, s. 67–77.

Gelatt, K.N. 2007. *Veterinary Ophthalmology*. Kirja 1, s. 3–31. 4. painos. Iowa USA: Blackwell.

Goldstein, D.B., Ruiz, L.A., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*. Vol. 139, s. 463–471.

Groop, L., Lyssenko, V. & Tuomi, T. 2007. Tyypin 2 diabeteksen genetiikka selviämässä - Taustalla monen heikkotehoisen alttiusgeenin yhteispeli. *Duodecim*. Vol. 123, s. 1449–1555.

Gupta, A., Neogi, R., Mukherjea, M., Mukhopadhyay, A., Roykhouhury, S., Senapati, A., Gangopadhyay, P.K. & Ray, K. 2003. DNA linkage based diagnosis of Wilson disease in asymptomatic siblings. *Indian Journal of Medical Research*. Vol. 118, s. 208–214.

Heikkinen, E., Korpi, M., Mattila, K., Porali, I. & Vihinen, M. 2002. Bioinformatiikan sanasto. Verkkodokumentti. CSC - Tieteellinen laskenta Oy. <<https://extras.csc.fi/bio-sciences/sanasto/latex/sanasto.pdf>>. Päivitetty 15.3.2002. Luettu 12.4.2011.

Herzog, R.W., Yang, E.Y., Couto, L.B., Hagstrom, J.N., Elwell, D., Fields, P.A., Burton, M., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Podsakoff, G.M., Nichols, T.C., Kurtzman, G.J. & High, K.A. 1999. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nature Medicine*. Vol. 5, s. 56–63.

Jalomäki, S. 2010. Glaukooma eli silmänpainetauti. Verkkodokumentti. <<http://www.apexvet.fi/webclinic/Sari/Glaukooma.pdf>>. Luettu 21.3.2011.

Jalomäki, S. & Anttila, M. 2001. Pektinaattiligamenttidysplasia ja glaukooma labradorinoutajalla. *Suomen Eläinlääkärilehti*. Vol. 107, s. 281–287.

Karjalainen, L. & Ojala, M. 1997. Generation intervals and inbreeding coefficients in the Finnish Hound and the Finnish Spitz. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. Vol. 114, s. 33–41.

Knottenbelt, C.M. & Knottenbelt, M.K. 1996. Black hair follicular dysplasia in a tricolour Jack Russell terrier. *Veterinary Record*. Vol. 138, s. 475–476.

KoiraNet-jalostustietojärjestelmä. <<http://jalostus.kennelliitto.fi>>. Luettu 28.4.2011.

Kuchtey, J., Olson, L.M., Rinkoski, T., MacKay, E.O., Iverson, T.M., Gelatt, K.N., Haines, J.L. & Kuchtey, R.W. 2011. Mapping of the disease locus and identification of *ADAMTS10* as a candidate gene in a canine model of primary open angle glaucoma. *PLoS Genetics*. Vol. 7.

Laffort-Dassot, C., Beco, L. & Carlotti, D.N. 2002: Follicular dysplasia in five Weimaraners. *Veterinary Dermatology*. Vol. 13, s. 253–260.

- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., de Jong, P.J., Nishino, S. & Mignot E. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. Vol. 98, s. 365–376.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas III, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., DeJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Broad Institute Genome Sequencing Platform & Lander, E.S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. Vol. 438, s. 803–819.
- Lohi, H. 2009. Geenitutkimus suomenajokoirien jalostuksessa. Luentomateriaali. Helsingin yliopisto.
- McGuigan, F.E.A. & Ralston S.H. 2002. Single nucleotide polymorphism detection: *allelic* discrimination using TaqMan. *Psychiatric Genetics*. Vol. 12, s. 133–136.
- Miettinen, H. & Vyhtinen, J. 2009. Kvantitatiivisten reaaliaikaisten EBV- ja BKV-PCR-menetelmien verifiointi Stratagene Mx3005P-laitteelle. Opinnäytetyö. Metropolia ammattikorkeakoulu.
- Mäki, K. 2004. Breeding against hip and elbow dysplasia in dogs. Väitöskirja. Helsingin yliopiston Kotieläintieteen laitos.
- Mäki, K. 2007. Geenitesteistä apua koiranjalostukseen – kaikkia ongelmia ne eivät kuitenkaan ratkaise. Verkkodokumentti. <<http://katariinamaki.com/artikkelit/Geenitestit.htm>>. Julkaistu 24.4.2007, geenitestitaulukko päivitetty 5.1.2009. Luettu 28.4.2011.
- Mäki, K., Groen, A.F., Liinamo, A-E. & Ojala, M. 2001. Population structure, inbreeding trend and their association with hip and elbow dysplasia in dogs. *Animal Science*. Vol. 73, s. 217-228.
- NCBI, The National Center for Biotechnology Information. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Luettu 28.3.2011.
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A. & Björkqvist, S-E. 2000. Ihmisen fysiologia ja anatomia. 12.–13. painos. Helsinki: Werner Söderström Osakeyhtiö.
- Panteleyev, A.A., Raus, R. & Christiano, A.M. 2000. Patterns of hairless (*hr*) gene expression in mouse hair follicle morphogenesis and cycling. *American Society for Investigative Pathology*. Vol. 157, s. 1071–1079.
- Parker, H.G., Kim, L.V., Sutter, N.B., Carlson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A. & Kruglyak, L. 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*. Vol. 304, s. 1160–1164.
- Pastural, E., Barrat, F.J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A. & de Saint Basile, G. 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the Myosin-Va gene. *Nature Genetics*. Vol. 16, s. 289-292.

Patterson, D.F. 2000. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 14, s. 1–9.

Philipp, U., Hamann, H., Mecklenburg, L., Nishino, S., Mignot, E., Günzel-Apel, A-R., Schmutz, S.M. & Leeb, T. 2005. Polymorphism within the canine *MLPH* gene are associated with dilute coat color in dogs. *BMC Genetics*. Vol. 6.

Petersen-Jones, S.M., Entz, D.D. & Sargan D.R. 1999. cGMP phosphodiesterase- α mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh Corgi dog. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. Vol. 40, s. 1637–1644.

Proschowsky, H.F., Rugbjerg, H. & Ersboll, A.K. 2003. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 58, s. 63–74.

Roche Diagnostics GmbH. 2008. LightCycler 480 instrument operator's manual, software version 1,5.

Sargan, D.R. 2004. IDID: Inherited diseases in dogs: Web-based information for canine inherited disease genetics. *Mammalian Genome*. Vol. 15, s. 503–506.

Savolainen, P., Zhang, Y., Luo, J., Lundeberg, J. & Leitner, T. 2002. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*. Vol. 298, s. 1 610–1 613.

Schmutz, S.M., Moker, J.S., Clark, E. G. & Shewfelt, R. 1998. Black hair follicular dysplasia, an autosomal recessive condition in dogs. *The Canadian Veterinary Journal*. Vol. 39, s. 644–646.

Schmutz, S.M. & Berryere, T.G. 2007. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal Genetics*. Vol. 38, s. 539–549.

Solunetti. 2006. Sanasto. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/sanasto/kaikki/>>. Luettu 18.3.2011.

Strom, M, Hume, A.N., Tarafder, A.K., Barkagianni, E. & Seabra, M.C. 2002. A family of Rab27-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, s. 25423-25430.

Suomen Ajokoirajärjestö. 2005. Suomenajokoiran jalostuksen tavoiteohjelma. Verkkodokumentti. <http://www.ajokoirajarjesto.fi/ajokoirista/jalostuksen_tavoiteohjelmat/JTO_suomenajok.pdf>. Luettu 21.3.2011.

Suomen Ajokoirajärjestö. Suomenajokoiran. Verkkodokumentti. <<http://www.ajokoirajarjesto.fi/ajokoirista/>>. Luettu 6.4.2011.

Suomen Beaglejärjestö. 2009. Beaglen jalostuksen tavoiteohjelma. Verkkodokumentti. <http://www.beaglejarjesto.fi/tiedostot/BEAGLEN_JTO_2009.pdf>. Luettu 14.7.2011.

Suomen Kennelliitto. 2011. Suomen suosituimmat rodut 2010. Verkkodokumentti. <http://www.kennelliitto.fi/NR/rdonlyres/A153BDDD-C9D2-4F4D-9B52-EE212558FED7/9133/Top_100_2010.pdf>. Julkaistu 3.1.2011. Luettu 6.4.2011.

Suomen Kennelliitto. Beaglen rotumääritelmä. Verkkodokumentti. <<http://www.kennelliitto.fi/NR/rdonlyres/01153C92-A938-42D3-B662-9B4A7D20523F/0/beagle204.pdf>>. Luettu 6.4.2011.

Suominen, I., Pärssinen, R., Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Särmä, P. 2011 Beaglen historiaa ja nykyisyyttä. Verkkodokumentti. Suomen Beaglejärjestö. <http://www.beaglejarjesto.fi/info/beagle_historiaa_ja_nykyisyytta.htm>. Luettu 6.4. 2011.

TIB Molbiol Syntheselabor GmbH. 2008. Oligonucleotides: Properties. Verkkodokumentti. <<http://www.tib-molbiol.com/oligonucleotides/properties/index.html>>. Luettu 6.5.2011.

Twyman, R. 2003. Linkage analysis: Finding the rough position of human disease genes relative to known genetic markers. Verkkodokumentti. Wellcome Trust. <http://genome.wellcome.ac.uk/doc_wtd020778.html>. Julkaistu 20.3.2003. Luettu 25.3.2011.

UCSC Genome Bioinformatics. <<http://genome.ucsc.edu/>>. Luettu 28.3.2011.

Vaheri, M. 2010. Geenitekniikka. Luentomuistiinpanot. Metropolia ammattikorkeakoulu.

Venta, P.J., Li, J., Yuzbasiyan-Gurkan, L., Brewer, G.J. & Schall W.D. 2000 Mutation causing von Willebrand's disease in Scottish Terriers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Vol. 14, s. 10–19.

von Bomhard, W., Mauldin, E.A., Schmutz, S.M., Leeb, T. & Casal, M.L. 2006. Black hair follicular dysplasia in Large Münsterländer dogs: clinical, histological and ultrastructural features. *European Society of Veterinary Dermatology*. Vol. 17, s. 182–188.

vonHoldt, B.M., Pollinger, J.P., Lohmueller, K.E., Han, E., Parker, H.G., Quignon, P., Degenhardt, J.D., Boyko, A.R., Earl, D.A., Auton, A., Reynolds, A., Bryc, K., Brisbin, A., Knowles, J.C., Mosher, D.S., Spady, T.C., Elkahoul, A., Geffen, E., Pilot, M., Jedrzejewski, W., Greco, C., Randi, E., Bannasch, D., Wilton, A., Shearman, J., Musiani, M., Cargill, M., Jones, P.G., Qian, Z., Huang, W., Ding, Z.L., Zhang, Y.P., Bustamante, C.D., Ostrander, E.A., Novembre, J. & Wayne, R.K. 2010. Genomewide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. Vol. 464, s. 898–902.

Weatherall, D.J. 2000. Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. *British Medical Journal*. Vol. 321, s. 1117–1120.

Webster, M.T. & Karlsson, E.K. 2009. Evolution of the dog genome. *Encyclopedia of Life Sciences*. Online library: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0021780/pdf>>. Julkaistu 15.12.2009. Luettu 12.4.2011.

Welle, M., Philipp, U., Rüfenacht, S., Roosje, P., Scharfenstein, M., Schütz, E., Brenig, B., Linek, M., Mecklenburg, L., Grest, P., Drögemüller, M., Haase, B., Leeb, T. & Drögemüller, C. 2009. MLPH genotype – melanin phenotype correlation in dilute dogs. *Journal of Heredity*. Vol. 100, s. 75–79.

Lista työssä käytetyistä suomenajokoiranäytteistä

ds = diagnosoitu sairas

es = epäilty sairas

k = kontrolli

Koiran nro.	Status	Sukupuoli	Syntymäaika	Oireiden alkamisajankohta (jos tiedossa)
1	ds	uros	3.4.2000	
2	ds	naaras	28.3.2002	
3	ds	naaras	2.4.1999	vuonna 2004
4	ds	uros	4.7.2004	
5	ds	naaras	22.5.2004	
6	ds	naaras	21.4.2004	3,5-vuotiaana
7	ds	uros	7.5.1999	vuonna 2006
8	ds	uros	8.3.2006	
9	ds	naaras	26.4.2004	
10	ds	uros	29.3.2007	patologin lausunto 16.4.2010
11	es	naaras	24.5.1996	6-vuotiaana
12	es	naaras	1.4.2007	
13	es	naaras	15.5.1996	
14	es	uros	15.3.2002	
15	es	naaras	10.4.2006	

Koiran nro.	Status	Oireet (jos tiedossa)
1	ds	
2	ds	
3	ds	Runsas karvanlähtö selästä ja kyljistä sekä toistuvat ihon hiivatulehdukset.
4	ds	
5	ds	
6	ds	Karvat lähtevät selästä.
7	ds	
8	ds	Ollut selässä näppylöitä, nyt mustan karvan alueelta karva ohentunut.
9	ds	
10	ds	
11	es	Selässä karvattomia läikkiä.
12	es	Selässä hilseilyä ja kutinaa sekä harventunutta karvaa n. 8 x 4 cm alueella.
13	es	Ihottumaa, selässä läiskämäinen karvanlähtö.
14	es	Esiintyy talvella kyljessä karvanlähtöä.
15	es	Laajat karvattomat alueet, hilseily ja kutina.

Koiran nro.	Status	Sukupuoli	Syntymäaika
16	k	uros	23.12.1994
17	k	uros	2.11.2005
18	k	uros	16.3.2002
19	k	uros	28.7.2005
20	k	uros	17.12.1999
21	k	naaras	22.10.2004
22	k	naaras	30.5.1999
23	k	naaras	22.5.2005
24	k	uros	29.3.2007
25	k	uros	22.6.2004
26	k	naaras	31.5.2006
27	k	uros	24.5.2006
28	k	uros	23.2.2001
29	k	uros	29.10.2004
30	k	naaras	6.6.2005

Lista suomenajokoirilta löydetyistä sekvenssimuutoksista

ds = diagnosoitu sairas

es = epäilty sairas

k = kontrolli

Koiran nro.	Status	Genotyypit: introniset muutokset			Etsitty genotyyppi
		kohta 92: C>A-muutos	kohta 273: C:n deleetio	kohta 278: G>T-muutos	
1	ds	A/A	wt/wt	wt/T	wt/A
2	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
3	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
4	ds	A/A	delC/delC	wt/wt	wt/wt
5	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
6	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
7	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
8	ds	A/A	wt/delC	-	wt/wt
9	ds	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
10	ds	A/A	wt/delC	-	wt/wt
11	es	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
12	es	A/A	wt/delC	-	wt/wt
13	es	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
14	es	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
15	es	A/A	wt/delC	-	wt/A
16	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
17	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
18	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
19	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
20	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
21	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
22	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
23	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
24	k	wt/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
25	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
26	k	A/A	wt/delC	-	wt/A
27	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt
28	k	A/A	wt/delC	-	wt/wt
29	k	A/A	delC/delC	wt/wt	wt/wt
30	k	A/A	wt/wt	wt/wt	wt/wt

Merkki

Selitys

-

Heterotsygoottisten deleetioiden takia sekvenssiä ei pysty lukemaan deleetiokohdan jälkeen